

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GEOCIÊNCIAS - GEOQUÍMICA

NAFISA RIZZINI ANSARI

APLICAÇÃO DE *BUNODOSOMA CAISSARUME PERNA PERNA* PARA ESTUDOS DE BIOMONITORAMENTO DE METAIS: caracterização da bioacumulação em microcosmos e dinâmica espacial na Baía de Guanabara



NITERÓI
2015

NAFISA RIZZINI ANSARI

APLICAÇÃO DE *BUNODOSOMA CAISSARUME PERNA PERNA* PARA ESTUDOS DE BIOMONITORAMENTO DE METAIS: caracterização da bioacumulação em microcosmos e dinâmica espacial na Baía de Guanabara

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Geociências da Universidade Federal Fluminense, em Cotutela com a Universidad de Oviedo como requisito parcial para a obtenção do **Grau de Doutor**.
Área de Concentração: **Geoquímica Ambiental**.

Orientador:

Prof. Dr. RENATO CAMPELLO CORDEIRO

Orientador Espanhol:

Prof. Dr. JÖRG BETTMER

Co-Orientadores

Prof. Dr. JEAN REMY DAVÉE GUIMARÃES

Prof. Dr. MARCOS ANTÔNIO DOS SANTOS FERNANDEZ

NITERÓI

2015

A617 Ansari, Nafisa Rizzini.

Aplicação de *Bunodosoma Caissarum* e *Perna Perna* para estudos de biomonitoramento de metais: caracterização da bioacumulação em microcosmos e dinâmica espacial na Baía de Guanabara / Nafisa Rizzini Ansari. – Niterói : [s.n.], 2015.

205 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado em Geociências - Geoquímica Ambiental) - Universidade Federal Fluminense, 2015. Orientador: Prof^o Dr^o Renato Campello Cordeiro. Orientador (cotutela): Prof^o Dr^o Jörg Bettmer.

1. Bioindicador. 2. Metal. 3. Fauna aquática. 4. Baía de Guanabara (RJ). 5. Arquipélago das Cagarras (RJ). 6. Produção intelectual. I. Título. II. Universidad de Oviedo.

CDD 574.52636



Universidad de Oviedo

Departamento de Química Física y Analítica

Doctorado en cotutela con la Universidade Federal Fluminense

APLICACIÓN DE *BUNODOSOMA CAISSARUM* Y *PERNA PERNA* PARA ESTUDIOS DE BIOMONITORIZACIÓN DE METALES: caracterización de la bioacumulación en microcosmos y dinámica espacial en la Bahía de Guanabara

TESIS DOCTORAL

Nafisa Rizzini Ansari

OVIEDO

2015



AUTORIZACIÓN PARA LA PRESENTACIÓN DE TESIS DOCTORAL

Año Académico: 2015

1.- Datos personales del autor de la Tesis	
Apellidos: RIZZINI ANSARI	Nombre: NAFISA
DNI/Pasaporte/NIE: FN210202	Correo electrónico: nafisarizzini@yahoo.com

2.- Datos académicos	
Programa de Doctorado cursado: GEOCIÊNCIAS (GEOQUÍMICA AMBIENTAL) EN COTUTELA CON LA UNIVERSIDAD DE OVIEDO	
Órgano responsable: QUÍMICA FÍSICA Y ANALÍTICA	
Departamento/Instituto en el que presenta la Tesis Doctoral: GEOCIÊNCIAS, UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE	
Título definitivo de la Tesis	
Español/Otro Idioma: APLICAÇÃO DE <i>BUNODOSOMA CAISSARUM</i> E <i>PERNA PERNA</i> PARA ESTUDOS DE BIOMONITORAMENTO DE METAIS: caracterização da bioacumulação em microcosmos e dinâmica espacial na Baía de Guanabara	Inglés: THE USE OF <i>BUNODOSOMA CAISSARUM</i> AND <i>PERNA PERNA</i> FOR METAL BIOMONITORING STUDIES: characteristics of bioaccumulation in microcosms and spatial dynamics in Guanabara Bay
Rama de conocimiento: CIENCIAS	

3.- Autorización del Director/es y Tutor de la tesis	
D.: RENATO CAMPELLO CORDEIRO	DNI/Pasaporte/NIE: FI69260
Departamento/Instituto: GEOCIÊNCIAS, UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE	
D.: JÖRG BETTMER	DNI/Pasaporte/NIE: X8817565D
Departamento/Instituto/Institución: QUÍMICA FÍSICA Y ANALÍTICA, UNIVERSIDAD DE OVIEDO	

Autoriza la presentación de la tesis doctoral en cumplimiento de lo establecido en el Art.30.1 del Reglamento de los Estudios de Doctorado, aprobado por el Consejo de Gobierno, en su sesión del día 17 de junio de 2013 (BOPA del 25 de junio de 2013)

Niterói, 27 de abril de 2015

Director de la Tesis

Fdo.: Jörg Bettmer

Director de la Tesis

Fdo.: Renato Campello Cordeiro

SR. DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE GEOCIÊNCIAS - UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE

FOR-MAT-VOA-009-BIS


NAFISA RIZZINI ANSARI

**APLICAÇÃO DE *Bunodosoma*
caissarum E *Perna perna* PARA ESTUDOS DE
BIOMONITORAMENTO DE METAIS: CARACTERIZAÇÃO
DA BIOACUMULAÇÃO EM MICROCOSMOS E DINÂMICA
ESPACIAL NA BAÍA DE GUANABARA.**

Tese apresentada ao Curso de Pós - Graduação
em Geociências da Universidade Federal Fluminense,
em Cotutela com a Universidad de Oviedo como
requisito parcial para a obtenção do **Grau**
de **Doutor**. Área de Concentração: **Geoquímica**
Ambiental.

Aprovada em abril de 2015.


BANCA EXAMINADORA




PROF. DR. RENATO CAMPELLO CORDEIRO
ORIENTADOR/UFF



PROF. DR. JÖRG BETTMER
ORIENTADOR/UNIVERSIDAD OVIEDO



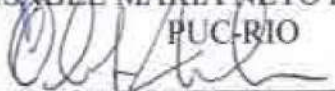
PROF. DR. JEAN REMY DAVÉE GUIMARAES
CO-ORIENTADOR/UFRI



PROF. DR. MARCOS ANTONIO DOS SANTOS FERNANDEZ
CO-ORIENTADOR/UERJ



PROFA. DRA. ISABEL MARIA NETO DA SILVA MOREIRA
PUC-RIO



PROF. DR. OLAF MALM
UFRI



PROF. DR. EDISON DAUSACKER BIDONE
UFF



PROF. DR. WILSON THADEU VALLE MACHADO
UFF

NITERÓI
2015

AGRADECIMENTOS

À minha mãe pelo carinho e cuidado sempre, por ser um exemplo de pessoa para mim, por sempre me apoiar em tudo e pelo grande suporte.

À minha irmã que tem a capacidade de ajudar todo mundo o tempo todo. Inclusive me ajudou muito com algumas traduções de meus textos que tive que fazer direto em inglês. Minha irmã e minha mãe são as melhores pessoas que conheço na vida e me sinto muito honrada de ser parte dessa família linda.

Ao meu companheiro Pedro Póvoa que me deu muito apoio durante o doutorado, aguentou junto comigo a dificuldade da distância para que eu pudesse fazer as análises na Espanha, aguentou meus momentos de estresse e de não poder sair por ter que estudar e que sempre me deu muito carinho e alegrias.

Ao Malcolm Bush por todo o carinho e apoio e pela grande ajuda nas revisões de meus textos em inglês. Aprendi muito e evoluí muito no inglês com a sua ajuda.

Ao Rudy Seidinger pela simpatia e pela ajuda com os problemas que só acontecem com o laptop quando estamos tentando escrever a tese.

Às minhas famílias Rizzini e Ansari por me darem carinho e apoio.

A todos os meus amigos pelo incentivo e boas conversas. Especialmente Fernanda Fleming e Renata Pederneiras, que me ajudaram a planilhar concentrações em sedimentos, que acabaram não entrando na tese pelo curto tempo.

A todos os amigos que fiz na geoquímica da UFF, especialmente Raffaella D'Angelo, Ana Paula Silva, Olga Venimar, Gabriel Martins, Luciane Moreira, Leandro Candeia, Monique Souza, Vinicius Kutter e Giovana Vignoli, que são pessoas muito boas, companheiras, solícitas e que sempre me deram apoio nos momentos difíceis.

À Natália D'Ávila Lima, Cesar A. M. M. Cordeiro, Pedro Póvoa, Bernardo Braz, Leandro Candeia e Renato C. Cordeiro pela ajuda na amostragem.

À Janaína L. Pereira pela grande ajuda nos experimentos realizados no laboratório de ecotoxicologia marinha (FAOC/UERJ), por sua dedicação e simpatia.

À Raquel Correia, Michele Marchezan e Clarissa Araújo por terem me ajudado muito no experimento realizado no laboratório de Traçadores W.C. Pfeiffer (UFRJ).

Aos meus companheiros e amigos do laboratório 400: Gabriel Martins, Luciane Moreira, Leandro Candeia, Joao Luca Horta, Victor de Freitas e Carolina Regis. Obrigada pela grande ajuda, conversas e risadas no laboratório.

À Tamara Iglesias, Nerea Fernández, Xavi Alonso, Lucía López, Mario Corte, Juan Soto, Sonia Fernández, Raquel González, Juan Gómez, Mario Fernández, Héctor González, Aitor Álvarez e todos do Departamento de Química Física y Analítica da Universidad de Oviedo pelo acolhimento e por me ensinarem tanto e me ajudarem nas minhas dúvidas com o HPLC acoplado à coluna SEC-200, ICP-MS, ESI-MS e nos cálculos de deconvolução isotópica. Sou muita grata por tê-los conhecido e por alguns terem se tornado meus amigos para sempre. Além de Doina Atofani, Maria Emilia e Martina Cinti que também vieram de outros países e foram muito companheiras.

À Bernardo Braz e Aline Soares que me ajudaram muito na determinação dos metais nas amostras da Baía de Guanabara e da região insular adjacente.

Ao professor Dr. Ricardo Erthal Santelli pela concessão da utilização do ICP-MS para a determinação de metais nas amostras.

Ao prof. Dr. Alberto Figueiredo por permitir o uso do liofilizador de seu laboratório.

À CAPES pela concessão das bolsas de estudos de Doutorado e do Programa Institucional de Bolsas de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE).

Ao prof. Dr. Renato Campello Cordeiro pela orientação, pelo grande apoio em tudo e por sua empolgação e energia nas coletas.

Ao prof. Dr. Jörg Bettmer, por ter aceitado me orientar na Universidad de Oviedo, por ter sido tão receptivo e pelos ensinamentos em química analítica.

Ao prof. Dr. Marcos A. S. Fernandez pela co-orientação, pela força que sempre me deu e pelo grande apoio para a realização das incubações com cádmio e zinco no laboratório de ecotoxicologia marinha da UERJ.

Ao prof. Dr. Jean R. D. Guimarães pela co-orientação, por me aceitar no laboratório de Traçadores W.C. Pfeiffer do Instituto de Biofísica (UFRJ) e pela atenção no tratamento dos dados e na correção do nosso artigo. Aprendi muito.

Ao Prof. Dr. Wilson Machado pela grande contribuição na pré-banca e banca.

Ao Prof. Dr. Olaf Malm, à Prof. Dr. Isabel Moreira, ao Prof. Dr. Wilson Machado e ao Prof. Dr. Edson Bidone pela participação e contribuições na banca desta tese.

Aos professores e funcionários da Geoquímica da UFF, por todo o apoio e simpatia. Especialmente à Meiber, pelo apoio para a realização do Doutorado Sanduíche e o acordo de Cotutela e ao Nivaldo e à Hildete, que estão sempre dispostos a ajudar.

RESUMO

Os objetivos do presente estudo foram avaliar a anêmona-do-mar *Bunodosoma caissarum* como espécie biomonitora da contaminação por metais para a Baía de Guanabara (Rio de Janeiro, Brasil) e a região insular adjacente, comparando-a com uma espécie tradicionalmente utilizada na região: o mexilhão *Perna perna*; além de investigar a bioacumulação de Cd, Hg e Zn por *B. caissarum* e *P. perna* por meio de experimentos de incubação em laboratório. A Baía de Guanabara é uma baía eutrófica contaminada por diversos metais. A região insular adjacente é considerada menos impactada por metais, porém esta é influenciada por aportes antrópicos, como os efluentes dos emissários submarinos e a disposição de material dragado em locais próximos a esta região. Bivalves, como o *P. perna*, são amplamente utilizados para o biomonitoramento de metais na Baía de Guanabara. No entanto, a anêmona *B. caissarum* pode ser uma alternativa em ambientes onde os mexilhões não são abundantes ou não existem. Neste estudo, mediram-se as concentrações de metais nos tecidos de *B. caissarum* e *P. perna* amostrados na Baía de Guanabara e na região insular adjacente em 2013 e estas foram comparadas com concentrações medidas nos mesmos locais em 2009. Os elementos Al, As, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Sn, Ti, V e Zn foram determinados por espectrometria de massa com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Foi observada uma grande variabilidade espacial e temporal nas concentrações dos metais nos tecidos de *B. caissarum* e *P. perna*. No entanto, ambas as espécies foram capazes de bioacumular todos os elementos estudados. Devido à abundância de *B. caissarum* na área de estudo e a sua capacidade de bioacumular os metais estudados, sugere-se seu uso como biomonitor de metais e seu potencial uso como biomonitor complementar para estudos de biomonitoramento com mais de uma espécie de invertebrado, como *P. perna*. Com esta finalidade, deve-se estudar melhor as características de bioacumulação de metais de interesse ambiental e ecotoxicológico, como Hg, Cd e Zn, por *B. caissarum* para possibilitar seu uso. Com este intuito, realizaram-se incubações com Hg, Cd e Zn em microcosmos com *B. caissarum* e *P. perna*. Os espécimes foram incubados com isótopos destes metais em aquários e as concentrações foram monitoradas durante o período de incubação. O experimento com Hg investigou como *B. caissarum* afeta a distribuição, metilação e volatilização de Hg adicionando-se o radiotraçador

^{203}Hg a microcosmos com e sem *B. caissarum*. Mediu-se o Hg total e o metilmercúrio (MeHg) por espectrometria gama e cintilação líquida respectivamente. Os espécimes apresentaram um fator de bioconcentração de 70. Observou-se a produção de MeHg em todos os microcosmos e uma maior volatilização de Hg nos microcosmos com *B. caissarum*. Nos experimentos com Cd e Zn, *spikes* enriquecidos em ^{116}Cd ou ^{68}Zn foram adicionados aos microcosmos com *B. caissarum* ou *P. perna* e as concentrações foram medidas através do monitoramento de razões isotópicas. Os fatores de bioconcentração para *B. caissarum* e *P. perna* expostos a $0,9 \mu\text{g L}^{-1}$ de ^{116}Cd foram respectivamente 80,5 e 850 e em espécimes expostos a $1,4 \mu\text{g L}^{-1}$, $6,9 \mu\text{g L}^{-1}$ e $34,7 \mu\text{g L}^{-1}$ de ^{68}Zn foram respectivamente 243, 398 e 340 em *B. caissarum* e 1789, 1238 e 621 em *P. perna*. As proteínas citosólicas associadas ao Cd e ao Zn foram extraídas dos tecidos dos espécimes incubados e analisadas por cromatografia de exclusão por tamanho e espectrometria de massa com fonte de plasma indutivamente acoplado. Frações citosólicas associadas ao Cd e ao Zn foram detectadas em ambas as espécies. Em todos os experimentos *B. caissarum* expeliu secreções mucosas que continham os isótopos adicionados. Estes estudos possibilitaram uma melhor compreensão das características de bioacumulação de Hg, Cd e Zn pelas espécies estudadas e fornecem subsídios para sua aplicação em estudos de biomonitoramento destes metais.

Palavras-chave: Biomonitores. Cnidários. Bivalves. Bioacumulação. Metais. Água do mar. Especiação química. Arquipélago das Cagarras. Ilha Redonda. Ilha Rasa.

ABSTRACT

The objectives of this study were to evaluate the sea anemone *Bunodosoma caissarum* as a biomonitor species for metal contamination in Guanabara Bay (Rio de Janeiro, Brazil) and an adjacent island region, by comparing it with another species traditionally used in the region: the mussel *Perna perna*. It was also to investigate the uptake of Cd, Hg and Zn through laboratory incubation experiments with both species. Guanabara Bay is an eutrophic bay contaminated by several metals. The adjacent island region is considered less impacted by metals, although that region is influenced by anthropic inputs, such as the effluents of submarine outfalls and the disposal of dredged material from surrounding sites. Bivalves, such as *P. perna*, are widely used for biomonitoring metal contamination in Guanabara Bay. However the sea anemone *B. caissarum* can be an alternative in sites where the mussels are not abundant or do not exist. In this study, metal concentrations were measured in the tissues of *B. caissarum* and *P. perna* sampled in Guanabara Bay and adjacent islands in 2013 and were compared to previous measurements in the same sites in 2009. The elements Al, As, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Sn, Ti, V and Zn were determined by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). There was a great spatial and temporal variability of metal concentrations in the tissues of *B. caissarum* and *P. perna*. Yet both species were able to bioaccumulate all the studied elements. Due to the abundance of *B. Caissarum* in the studied area and its capacity to bioaccumulate the studied elements, its use as a biomonitor of metals is suggested and its potential use as a complementary biomonitor. For this purpose, it is necessary to better understand the bioaccumulation characteristics of metals of environmental and ecotoxicological concern by *B. caissarum*. So, incubations were carried out with Hg, Cd and Zn in microcosms with *B. caissarum* and *P. perna*. Specimens were incubated with isotopes of these metals in aquariums and concentrations were monitored during an incubation period. The Hg experiment investigated how *B. caissarum* affects Hg distribution, methylation and volatilization by adding the radiotracer ^{203}Hg to microcosms with and without the sea anemone. Total Hg and methylmercury (MeHg) were measured respectively by gamma spectrometry and liquid scintillation. Specimens presented a bioconcentration factor of 70. There was MeHg production in all microcosms and a higher Hg volatilization occurred in microcosms with *B. caissarum*. In Cd and Zn

experiments, enriched ^{116}Cd or ^{68}Zn spikes were added to microcosms with *B. caissarum* or *P. perna* and concentrations were measured by monitoring isotope ratios. Bioconcentration factors for *B. caissarum* and *P. perna* exposed to $0.9 \mu\text{g L}^{-1}$ of ^{116}Cd were respectively 80.5 and 850. In specimens exposed to $1.4 \mu\text{g L}^{-1}$, $6.9 \mu\text{g L}^{-1}$ and $34.7 \mu\text{g L}^{-1}$ of ^{68}Zn those factors were respectively 243, 398 and 340 in *B. caissarum* and 1789, 1238 and 621 for *P. perna*. Cytosolic proteins associated with Cd and Zn from the tissues of the incubated specimens were extracted and analyzed by size-exclusion chromatography and inductively coupled plasma-mass spectrometry. Cd and Zn-accumulating cytosolic fractions were detected in both species. In all experiments *B. caissarum* expelled mucus secretions that contained the added isotopes. These studies enabled a better understanding of the bioaccumulation characteristics of Hg, Cd and Zn by the studied species and can contribute to their use in biomonitoring studies with these metals.

Keywords: Biomonitors. Cnidarians. Bivalves. Bioaccumulation. Metals. Seawater. Chemical speciation. Cagarras Archipelago. Redonda Island. Rasa Island.

RESUMEN

Los objetivos de este estudio han sido la evaluación de la anémona de mar *Bunodosoma caissarum* como especie bioindicadora de la contaminación por metales en la Bahía de Guanabara (Río de Janeiro, Brasil) y la región insular adyacente, comparándola con otra especie utilizada tradicionalmente en la región: el mejillón *Perna perna*, así como investigar la bioacumulación y distribución de Cd, Hg y Zn a través de experimentos de incubación llevados a cabo en el laboratorio con dichas especies. La bahía de Guanabara es una zona eutrófica que se encuentra contaminada por una variedad de metales pesados. La región de la isla adyacente es considerada menos influida por esta contaminación aunque sí lo está por vertidos antropogénicos como los efluentes de emisarios submarinos y la eliminación de materiales de dragado de las zonas circundantes. Los mejillones como el *P. perna* ya han sido ampliamente utilizados para la monitorización de contaminaciones por metales pesados en la Bahía de Guanabara. Sin embargo, la anémona marina *B. caissarum* se presenta como una alternativa a los mejillones en zonas en que estos no existan o sean muy poco abundantes. En el estudio llevado a cabo, la concentración de metales se midió en los tejidos de *B. caissarum* y de *P. perna* que se habían recogido en la bahía de Guanabara y en las islas colindantes en el año 2013. Además, se compararon estos valores con análisis previos que habían sido realizados en las mismas zonas en el año 2009. Se han determinado Al, As, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Sn, Ti, V y Zn por espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo. Se ha observado una gran variabilidad, tanto espacial como temporal, de las concentraciones de metal en tejidos de *B. caissarum* y *P. perna*. Ambas especies han sido capaces de bioacumular todos los elementos bajo estudio. Debido a la abundancia de *B. caissarum* en el área estudiada y su capacidad para bioacumular dichos elementos, se sugiere su uso como bioindicador de la contaminación por metales y su uso potencial como un biomonitor complementario. Para ello, sería necesario un mejor conocimiento de la bioacumulación por *B. caissarum* de metales de interés medioambiental y ecotoxicológico, como Hg, Cd y Zn, para permitir su uso como bioindicador. Con el objetivo de corroborarlo, se llevaron a cabo incubaciones con Hg, Cd y Zn en microcosmos con *B. caissarum* y *P. perna*. Dichos especímenes se incubaron en acuarios a los que se añadieron isótopos de

estos metales cuyas concentraciones se fueron midiendo durante el proceso de incubación. Con el experimento llevado a cabo con el Hg, se estudió como afecta la *B. caissarum* a su distribución, metilación y volatilización. Para ello, se añadió el trazador radioactivo ^{203}Hg al microcosmos en ausencia y en presencia de la anémona. El Hg total y su especie metilada, el metilmercurio (MeHg), han sido analizadas mediante espectrometría gamma y de centelleo líquido, respectivamente. La *B. caissarum* presentó un factor de bioconcentración de 70. Cuando el microcosmos se encontraba en presencia de *B. caissarum* se observó una mayor volatilización de Hg. En todos los microcosmos del experimento, se observó una producción de MeHg. En los experimentos llevados a cabo para Cd y Zn se añadieron los trazadores isotópicos ^{116}Cd y ^{68}Zn a los microcosmos de *B. caissarum* o *P. perna* y las concentraciones se calcularon mediante la monitorización de las relaciones isotópicas de ambos elementos. Los factores de bioconcentración para *B. caissarum* y *P. perna*, expuestos a $0,9 \mu\text{g L}^{-1}$ de ^{116}Cd , fueron 80,5 y 850, respectivamente. Cuando los mismos ejemplares se expusieron a $1,4 \mu\text{g L}^{-1}$, $6,9 \mu\text{g L}^{-1}$ y $34,7 \mu\text{g L}^{-1}$ de ^{68}Zn , los factores de bioconcentración fueron respectivamente 243, 398 y 340 para *B. caissarum* y 1789, 1238 y 621 para *P. perna*. Las proteínas citosólicas asociadas con Cd y Zn han sido extraídas de los tejidos de los ejemplares incubados y analizadas mediante cromatografía de exclusión por tamaños acoplada a espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo. Las fracciones citosólicas que acumulan Cd y Zn fueron detectadas en ambas especies. En todos los experimentos llevados a cabo, *B. caissarum* ha secretado mucosidades en las cuales se detectaban todos los isótopos añadidos. Estos estudios permitieron entender mejor las características bioacumulativas de Hg, Cd y Zn de las especies estudiadas y contribuyen a su uso en estudios de biomonitorización con estos metales.

Keywords: Biomonitores. Cnidarios. Bivalvos. Bioacumulación. Metales. Agua de mar. Especiación química. Archipiélago Cagarras. Isla Redonda. Isla Rasa.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Anêmona <i>Bunodosoma caissarum</i>	35
Figura 2 - Mexilhão <i>Perna perna</i>	39
Figura 3 - Pontos de amostragem em vermelho. Ilha Rasa, Ilha Redonda, Ilha Comprida, Cotunduba, Forte da Lage, Pilar da Ponte Rio - Niterói e Ilha do Governador.	499
Figura 4 - Gráficos das médias das concentrações de cádmio (mg/kg) em <i>Bunodosoma caissarum</i> e <i>Perna perna</i> ao longo das estações de amostragem.....	58
Figura 5 - Distribuição das concentrações de cádmio (mg/kg) em <i>B. caissarum</i> (A) e <i>P. perna</i> (M) ao longo dos setores externo, entrada e interno nas amostragens 1C (2009) e 2C (2013).....	60
Figura 6 - Gráficos das médias das concentrações de arsênio (mg/kg) em <i>Bunodosoma caissarum</i> e <i>Perna perna</i> ao longo das estações de amostragem.....	61
Figura 7 - Distribuição das concentrações de arsênio (mg/kg) em <i>B. caissarum</i> (A) e <i>P. perna</i> (M) ao longo dos setores externo, entrada e interno nas amostragens 1C (2009) e 2C (2013).....	63
Figura 8 - Gráficos das médias das concentrações de vanádio (mg/kg) em <i>Bunodosoma caissarum</i> e <i>Perna perna</i> ao longo das estações de amostragem.....	64
Figura 9 - Distribuição das concentrações de vanádio (mg/kg) em <i>B. caissarum</i> (A) e <i>P. perna</i> (M) ao longo dos setores externo, entrada e interno nas amostragens 1C (2009) e 2C (2013).....	66
Figura 10 - Gráficos das médias das concentrações de bário (mg/kg) em <i>Bunodosoma caissarum</i> e <i>Perna perna</i> ao longo das estações de amostragem.....	67
Figura 11 - Distribuição das concentrações de bário (mg/kg) em <i>B. caissarum</i> (A) e <i>P. perna</i> (M) ao longo dos setores externo, entrada e interno nas amostragens 1C (2009) e 2C (2013).....	68
Figura 12 - Gráficos das médias das concentrações de zinco (mg/kg) em <i>Bunodosoma caissarum</i> e <i>Perna perna</i> ao longo das estações de amostragem.....	69
Figura 13 - Distribuição das concentrações de zinco (mg/kg) em <i>B. caissarum</i> (A) e <i>P. perna</i> (M) ao longo dos setores externo, entrada e interno nas amostragens 1C (2009) e 2C (2013).....	71
Figura 14 - Gráficos das médias das concentrações de ferro (mg/kg) em <i>Bunodosoma caissarum</i> e <i>Perna perna</i> ao longo das estações de amostragem.....	73
Figura 15 - Distribuição das concentrações de ferro (mg/kg) em <i>B. caissarum</i> (A) e <i>P. perna</i> (M) ao longo dos setores externo, entrada e interno nas amostragens 1C (2009) e 2C (2013).....	74
Figura 16 - Gráficos das médias das concentrações de manganês (mg/kg) em <i>Bunodosoma caissarum</i> e <i>Perna perna</i> ao longo das estações de amostragem.....	75
Figura 17 - Distribuição das concentrações de manganês (mg/kg) em <i>B. caissarum</i> (A) e <i>P. perna</i> (M) ao longo dos setores externo, entrada e interno nas amostragens 1C (2009) e 2C (2013).	76
Figura 18 - Gráficos das médias das concentrações de cobre (mg/kg) em <i>Bunodosoma caissarum</i> , <i>Perna perna</i> e no material particulado ao longo das estações de amostragem.	78
Figura 19 - Distribuição das concentrações de cobre (mg/kg) em <i>B. caissarum</i> (A) e <i>P. perna</i> (M) ao longo dos setores externo, entrada e interno nas amostragens 1C (2009) e 2C (2013).....	79

Figura 20 - Gráficos das médias das concentrações de alumínio (mg/kg) em <i>Bunodosoma caissarum</i> e <i>Perna perna</i> ao longo das estações de amostragem.....	80
Figura 21 - Distribuição das concentrações de alumínio (mg/kg) em <i>B. caissarum</i> (A) e <i>P. perna</i> (M) ao longo dos setores externo, entrada e interno nas amostragens 1C (2009) e 2C (2013).....	81
Figura 22 - Gráficos das médias das concentrações de titânio (mg/kg) em <i>Bunodosoma caissarum</i> e <i>Perna perna</i> ao longo das estações de amostragem.....	82
Figura 23 - Distribuição das concentrações de titânio (mg/kg) em <i>B. caissarum</i> (A) e <i>P. perna</i> (M) ao longo dos setores externo, entrada e interno nas amostragens 1C (2009) e 2C (2013).....	83
Figura 24 - Gráficos das médias das concentrações de chumbo (mg/kg) em <i>Bunodosoma caissarum</i> e <i>Perna perna</i> ao longo das estações de amostragem.....	84
Figura 25 - Distribuição das concentrações de chumbo (mg/kg) em <i>B. caissarum</i> (A) e <i>P. perna</i> (M) ao longo dos setores externo, entrada e interno nas amostragens 1C (2009) e 2C (2013).....	85
Figura 26 - Gráficos das médias das concentrações de cromo (mg/kg) em <i>Bunodosoma caissarum</i> e <i>Perna perna</i> ao longo das estações de amostragem.....	86
Figura 27 - Distribuição das concentrações de cromo (mg/kg) em <i>B. caissarum</i> (A) e <i>P. perna</i> (M) ao longo dos setores externo, entrada e interno nas amostragens 1C (2009) e 2C (2013).....	87
Figura 28 - Gráficos das médias das concentrações de estanho (mg/kg) em <i>Bunodosoma caissarum</i> e <i>Perna perna</i> ao longo das estações de amostragem.....	88
Figura 29 - Distribuição das concentrações de estanho (mg/kg) em <i>B. caissarum</i> (A) e <i>P. perna</i> (M) ao longo dos setores externo, entrada e interno na amostragem 2C (2013).....	89
Figura 30 - Gráficos das médias das concentrações de níquel (mg/kg) em <i>Bunodosoma caissarum</i> e <i>Perna perna</i> ao longo das estações de amostragem.....	90
Figura 31 - Distribuição das concentrações de níquel (mg/kg) em <i>B. caissarum</i> (A) e <i>P. perna</i> (M) ao longo dos setores externo, entrada e interno nas amostragens 1C (2009) e 2C (2013).....	92
Figura 32 - Análise de componentes principais das concentrações de metais e arsênio em <i>B. caissarum</i> para as amostragens de 2009 e 2013.....	94
Figura 33 - Análise de componentes principais das concentrações de metais e arsênio em <i>P. perna</i> para as amostragens de 2009 e 2013.....	95
Figura 34 - Análise de agrupamentos das médias das concentrações de metais em <i>B. caissarum</i> ao longo das estações de amostragem (Método Wards). Amostragem 2009 e 2013.	97
Figura 35 - Análise de agrupamentos das médias das concentrações de metais em <i>P. perna</i> ao longo das estações de amostragem (Método Wards). Amostragem 2009 e 2013.	98
Figura 36 - Incubações contendo somente água do mar (dessecador superior) e água do mar e <i>B. caissarum</i> (dessecador inferior).....	1044
Figura 37 - Atividade de ^{203}Hg em <i>B. caissarum</i> durante incorporação (a), depuração (b) e na água do mar dos microcosmos com (c) e sem <i>B. caissarum</i> (d).	1100
Figura 38 - Distribuição de HgT (%) em diferentes compartimentos dos microcosmos com e sem <i>B. caissarum</i>	111
Figura 39 - Média de Distribuição de HgT (%) em diferentes compartimentos dos microcosmos com e sem <i>B. caissarum</i>	114
Figura 40 - Incubações em aquários contendo água do mar e água do mar e <i>B. caissarum</i>	118

Figura 41 - Incubações em aquários contendo água do mar e água do mar e <i>P. perna</i> .	118
Figura 42 - Concentrações de ^{116}Cd na água do mar filtrada do: 1a) microcosmos contendo <i>B. caissarum</i> (T1ACd), 1b) microcosmos contendo <i>P. perna</i> - tratamento 1 (T1MCd) e 1c) microcosmos contendo <i>P. perna</i> - tratamento 2 (T2MCd). A letra “e” representa medida antes da nova adição de <i>spike</i> e a letra “s” representa medida logo após a nova adição de <i>spike</i> . O RSD (desvio padrão relativo) das determinações de ^{116}Cd na água do mar foi em média 0,01%.	130
Figura 43 - Concentrações de ^{116}Cd em <i>B. caissarum</i> (ToA (controle) e T1ACd (tratamento 1) e em <i>P. perna</i> (ToM (controle), T1MCd (tratamento 1) e T2MCd (tratamento 2)). O RSD médio das determinações de Cd nos tecidos dos organismos foi de 0,001%.	132
Figura 44 - Cromatogramas SEC-UV/Vis de extratos (a) <i>B. caissarum</i> (T1ACd - tratamento 1). (b) <i>P. perna</i> (T(1/2)MCd- tratamentos 1 e 2) e (c) secreção mucosa de <i>B. caissarum</i> .	137
Figura 45 - Cromatogramas SEC-ICP-MS de extratos de <i>B. caissarum</i> : (a) ToA (controle) e (b) T1ACd (tratamento 1); de secreção mucosa de <i>B. caissarum</i> : (c) ToA (controle) e (d) T1ACd (tratamento 1); e de <i>P. perna</i> : (e) ToM (controle), (f) T1MCd (tratamento 1) e (g) T2MCd (tratamento 2).	139
Figura 46 - Concentrações de ^{68}Zn em <i>B. caissarum</i> (T1AZn, T2AZn e T3AZn) e <i>P. perna</i> (T1MZn, T2MZn e T3MZn). O RSD médio das determinações de Zn nos tecidos dos organismos foi de 0,001%.	150
Figura 47 - Cromatogramas SEC-UV/Vis de extratos (a) <i>B. caissarum</i> (T(1/2/3)AZn – tratamentos 1, 2 e 3). (b) <i>P. perna</i> (T(1/2/3)MCd- tratamentos 1, 2 e 3) e (c) secreção mucosa de <i>B. caissarum</i> .	153
Figura 48 - Cromatogramas SEC-ICP-MS de extratos de (a) <i>B. caissarum</i> (ToA - controle), (b) <i>B. caissarum</i> (T1AZn - tratamento 1), (c) <i>B. caissarum</i> (T2AZn - tratamento 2) e (d) <i>B. caissarum</i> (T3AZn - tratamento 3).	155
Figura 49 - Cromatogramas SEC-ICP-MS de extratos de (e) secreção mucosa de <i>B. caissarum</i> (ToA – controle), (f) secreção mucosa de <i>B. caissarum</i> (T3AZn - tratamento 3), (g) <i>P. perna</i> (ToM- controle), (h) <i>P. perna</i> (T1MZn- tratamento 1), (i) <i>P. perna</i> (T2MZn- tratamento 2) e (j) <i>P. perna</i> (T3MZn- tratamento 3).	156

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Estações de amostragem 2009 (n = 7) e 2013 (n = 6) e suas respectivas coordenadas.....	48
Tabela 2- Limites de detecção da determinação de metais nas amostras em mg/kg e recuperações dos CRMs em porcentagem (%).....	52
Tabela 3- Médias e desvio padrão das concentrações (mg kg ⁻¹) de metais em <i>B. caissarum</i> nas estações de amostragem em 2009 e 2013	55
Tabela 4- Médias e desvio padrão das concentrações (mg kg ⁻¹) de metais em <i>P. perna</i> nas estações de amostragem em 2009 e 2013	56
Tabela 5- Teste U de Mann-Whitney entre as médias das concentrações de cada metal encontrado em <i>Bunodosoma caissarum</i> e as concentrações do mesmo metal encontradas em <i>Perna perna</i> nas amostragens de 2009 e 2013. Os resultados assinalados são significativos a p<0,05	96
Tabela 6- Médias das concentrações em mg/kg de metais em <i>Perna perna</i> em diferentes locais do Estado do Rio de Janeiro	100
Tabela 7- Médias das concentrações em mg/kg de metais em <i>Bunodosoma caissarum</i> na Baía de Guanabara e na área externa à baía.....	100
Tabela 8- Descrição dos procedimentos de extração testados.....	121
Tabela 9- Recuperação de Cd nos materiais de referência NIST 1566b e BCR 278R utilizando diferentes procedimentos de extração	133
Tabela 10- Proteínas identificadas na fração PSMT das amostras T1ACd	141
Tabela 11- Proteínas identificadas na fração PSMT das amostras T3MZn	157

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Al	Alumínio
As	Arsênio
Ba	Bário
Cd	Cádmio
COD	Carbono Orgânico Dissolvido
COT	Carbono Orgânico Total
CRM	Material Certificado de Referência
Cr	Cromo
Cu	Cobre
ESI-MS	Espectrometria de massas com ionização por eletrospray
Fe	Ferro
ICP-MS	Espectrômetro de massa com fonte de plasma indutivamente acoplado
Mn	Manganês
MPS	Material Particulado em Suspensão
MTs	Metalotioneínas
N.D.	Não determinado
Ni	Níquel
PAPMs	Proteínas de alto peso molecular
Pb	Chumbo
PBPMs	Proteínas de baixo peso molecular
PSMTs	Proteínas similares às metalotioneínas
SEC	Cromatografia de exclusão por tamanho
Ti	Titânio
Sn	Estanho
V	Vanádio
Zn	Zinco

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	11
RESUMEN	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	18
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	16
1 INTRODUÇÃO	21
1.1 BAÍA DE GUANABARA E REGIÃO INSULAR ADJACENTE	21
1.2 ORGANISMOS MONITORES DE METAIS	23
1.3 EXPERIMENTOS DE INCUBAÇÃO EM MICROCOSMOS.....	25
1.4 ORGANIZAÇÃO DO PRESENTE ESTUDO.....	26
2 OBJETIVOS	28
2.1 OBJETIVOS GERAIS	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	29
3.1 METAIS E COMPARTIMENTOS AMBIENTAIS	29
3.2 ORGANISMOS BIOMONITORES DE METAIS-TRAÇO	32
3.3 A ANÊMOMA-DO-MAR <i>BUNODOSOMA CAISSARUM</i>	34
3.4 O MEXILHÃO <i>PERNA PERNA</i>	38
4 DISTRIBUIÇÃO DE METAIS NA BAÍA DE GUANABARA E REGIÃO INSULAR ADJACENTE	42
4.1 INTRODUÇÃO.....	42
4.2 ÁREA DE TRABALHO.....	44
4.3 MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.3.1 Amostragem	47
4.3.2 Análises de amostras no laboratório	50
4.3.2.1 Determinação de metais em anêmonas e mexilhões	50
4.3.2.2 Determinação de metais no material particulado em suspensão.....	51
4.3.2.3 Limites de detecção e recuperação dos padrões.....	52
4.3.2.4 Determinação de carbono orgânico total na água	52
4.3.2.5 Tratamento estatístico dos resultados.....	53

4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.4.1	Metais	53
4.4.1.1	Cádmio	57
4.4.1.2	Arsênio.....	61
4.4.1.3	Vanádio.....	64
4.4.1.4	Bário.....	67
4.4.1.5	Zinco	69
4.4.1.6	Ferro	72
4.4.1.7	Manganês	75
4.4.1.8	Cobre	77
4.4.1.9	Alumínio	80
4.4.1.10	Titânio.....	82
4.4.1.11	Chumbo.....	84
4.4.1.12	Cromo.....	86
4.4.1.13	Estanho	88
4.4.1.14	Níquel.....	90
4.4.1.15	Discussão integrada dos resultados.....	93
5	BIOACUMULAÇÃO DE MERCÚRIO POR <i>B. CAISSARUM</i> E ESTUDOS DE ESPECIAÇÃO DE MERCÚRIO	101
5.1	INTRODUÇÃO.....	101
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS	102
5.2.1	Amostragem e aclimatação	102
5.2.2	Incubação.....	103
5.2.3	Análise das amostras em laboratório.....	105
5.2.4	<i>Bunodosoma caissarum</i>.....	106
5.2.5	Água do mar	107
5.2.6	Volatilização.....	107
5.2.7	Partículas depositadas, secreções mucosas, adsorção às paredes dos microcosmos, graxa de silicone e tubos de silicone de aeração	107

5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	108
5.3.1	Atividade de ²⁰³ HgT em <i>B. caissarum</i> e na água do mar	108
5.3.2	Distribuição de mercúrio total	110
5.3.3	MeHg na água do mar e em <i>B. caissarum</i>	112
6	BIOACUMULAÇÃO DE CÁDMIO POR <i>B. CAISSARUM</i> E <i>P. PERNA</i> E ESTUDOS DE ESPECIAÇÃO DE CÁDMIO NESTAS ESPÉCIES.....	116
6.1	INTRODUÇÃO.....	116
6.2	MATERIAIS E MÉTODOS	117
6.2.1	Amostragem e aclimação	117
6.2.2	Incubação com ¹¹⁶ Cd.....	118
6.2.3	Extração dos tecidos de <i>B. caissarum</i> e <i>P. perna</i> para a determinação de ¹¹⁶ Cd total	120
6.2.4	Extração de proteínas dos tecidos de <i>B. caissarum</i> e <i>P. perna</i>	120
6.2.5	Análise de diluição isotópica	122
6.2.5.1	Isotope pattern deconvolution (IPD)	123
6.2.6	Determinação da concentração de ¹¹⁶ Cd nas amostras	125
6.2.7	Cromatografia líquida	125
6.2.8	Análises de ESI-MS	126
6.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	127
6.3.1	Concentrações de ¹¹⁶ Cd na água do mar.....	128
6.3.2	Concentrações de ¹¹⁶ Cd em <i>B. caissarum</i> e <i>P. perna</i>	131
6.3.3	Recuperação de Cd utilizando diferentes procedimentos de extração de proteínas.....	132
6.3.4	Extração de Cd da fração citosólica dos tecidos de <i>B. caissarum</i> e <i>P. perna</i>	133
6.3.5	Especiação elementar de Cd em <i>B. caissarum</i> e <i>P. perna</i>	134
6.3.6	Identificação de proteínas através da análise ESI-MS/MS.....	140
7	BIOACUMULAÇÃO DE ZINCO POR <i>B. CAISSARUM</i> E <i>P. PERNA</i> E ESTUDOS DE ESPECIAÇÃO DE ZINCO NESTAS ESPÉCIES	142
7.1	INTRODUÇÃO.....	142

7.2	MATERIAIS E MÉTODOS	143
7.2.1	Amostragem e aclimação	143
7.2.2	Incubação com ⁶⁸ Zn	144
7.2.3	Extração dos tecidos de <i>B. caissarum</i> e <i>P. perna</i> para a determinação de ⁶⁸ Zn total.....	145
7.2.4	Extração de proteínas dos tecidos de <i>B.caissarum</i> e <i>P. perna</i>	146
7.2.5	Determinação da concentração de ⁶⁸ Zn nas amostras	146
7.2.6	Cromatografia líquida	147
7.2.7	Análises de ESI-MS	147
7.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	147
7.3.1	Concentrações de ⁶⁸ Zn na água do mar	147
7.3.2	Concentrações de ⁶⁸ Zn em <i>B. caissarum</i> e <i>P. perna</i>	148
7.3.3	Extração de proteínas associadas ao ⁶⁸ Zn.....	151
7.3.4	Especiação de Zn em <i>B. caissarum</i> e <i>P. perna</i>	151
7.3.5	Identificação de proteínas através da análise ESI-MS/MS.....	157
8	CONCLUSÃO	158
9	RECOMENDAÇÕES FINAIS	163
10	REFERÊNCIAS.....	164
11	ANEXOS	188
11.1	ANEXO 1. SIMULAÇÃO DAS PLUMAS DOS EMISSÁRIOS SUBMARINOS	189
11.2	ANEXO 2. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E CARGA DE MPS NO MOMENTO DAS AMOSTRAGENS NOS ANOS DE 2009 E 2013	190
11.3	ANEXO 3. MÉDIAS DAS CONCENTRAÇÕES DE METAIS NO MPS AO LONGO DAS ESTAÇÕES DE AMOSTRAGEM.....	191
11.4	ANEXO 4. TABELA DOS LIMITES PERMITIDOS PELA LEGISLAÇÃO PARA METAIS EM ALIMENTOS	193
11.5	ANEXO 5. MATRIZES DE CORRELAÇÃO PARA CONCENTRAÇÕES EM <i>B.CAISSARUM</i>	194
11.6	ANEXO 6. MATRIZES DE CORRELAÇÃO PARA CONCENTRAÇÕES EM <i>P. PERNA</i>	195
12	APÊNDICE.....	196

1 INTRODUÇÃO

A história das civilizações ocidentais é marcada por problemáticas relações com o meio ambiente. Os recursos que a natureza fornece sempre foram aproveitados, porém muitas vezes de formas não sustentáveis, com diversas manifestações e práticas de destruição, exploração e falta de cuidados com o meio ambiente. Atualmente, com a maior percepção das consequências que estas práticas geraram, há um aumento da preocupação com o meio ambiente no sentido de prevenir e tentar reverter a contaminação ambiental.

As regiões costeiras sempre foram umas das localidades mais procuradas pelas comunidades humanas para se instalarem devido à facilidade para o transporte aquático e por ser fonte de alimentos, como peixes e mexilhões. As consequências desta ocupação territorial próxima à zona costeira são o aporte de grandes quantidades de rejeitos antrópicos para estas áreas e a sobre-exploração de seus recursos. O aporte de material continental para os ambientes aquáticos possui, em geral, origem industrial, doméstica, agrícola e portuária e atinge estes ecossistemas principalmente por meio do escoamento, da deposição atmosférica e da descarga fluvial. Desta forma, estas áreas estão sujeitas à eutrofização e à contaminação por diversos compostos químicos, como os metais. As principais fontes antrópicas de metais para os ecossistemas aquáticos são a queima de combustíveis fósseis, os efluentes domésticos e industriais (siderúrgicas, metalúrgicas, etc.), a mineração e os fertilizantes.

1.1 BAÍA DE GUANABARA E REGIÃO INSULAR ADJACENTE

A Baía de Guanabara situa-se na região metropolitana do estado do Rio de Janeiro, Brasil. A sua bacia de drenagem apresenta um histórico de crescente urbanização e ocupação industrial e por muitas décadas a baía tem recebido diferentes tipos de descargas, como efluentes domésticos e industriais, sem o tratamento adequado (KJERFVE et al., 1997; CARREIRA et al., 2004; CORDEIRO et al., 2008; FONSECA et al., 2009; KALAS et al., 2009). Carreira et al. (2002) detectou um aumento significativo de carbono orgânico total nos sedimentos da baía nos últimos 100 anos. A baía de Guanabara é considerada altamente eutrófica

(CARREIRA et al., 2002; WAGENER et al., 2012) e concentra altos níveis de contaminantes, como metais, nos seus sedimentos (KEHRIG et al., 2003; BAPTISTA NETO et al., 2006; FONSECA et al., 2009; DONNICI et al., 2012). Com isso, é importante avaliar a disponibilidade destes metais à biota utilizando espécies bioindicadoras que auxiliem na identificação de áreas críticas, nas quais concentrações biologicamente ativas estão presentes.

A Ilha Rasa, a Ilha Redonda e o Arquipélago das Cagarras estão situados na região insular adjacente à Baía de Guanabara. O Arquipélago das Cagarras e a Ilha Redonda integram uma unidade de conservação marinha classificada como Monumento Natural das Ilhas Cagarras. Foram observadas, nos tecidos de algumas espécies provenientes destas ilhas, concentrações de alguns metais às vezes próximas às encontradas no interior da Baía de Guanabara e até maiores, como foi o caso das concentrações de cádmio encontradas em esponjas *Hymeniacidon heliophila* e *Paraleucilla magna* por Batista et al. (2014), em moluscos *Perna perna* (FRANCIONI, 1997; RIZZINI-ANSARI, 2011) e em anêmonas-do-mar *Bunodosoma caissarum* (RIZZINI-ANSARI, 2011). Além do cádmio, Rizzini-Ansari (2011) encontrou maiores concentrações de bário em *B. caissarum* provenientes das ilhas e para *P. perna* o vanádio foi mais alto nesta região insular do que na Baía de Guanabara. Neste estudo, foram determinadas as concentrações dos metais Al, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Ti, V e Zn em *B. caissarum* e *P. perna* provenientes da Baía de Guanabara e da região insular adjacente, a qual tinha sido escolhida anteriormente como área controle para o estudo. No entanto, para alguns metais as concentrações encontradas nas ilhas oceânicas foram maiores ou próximas às encontradas no setor interno da baía, considerado mais contaminado por metais. Estas maiores concentrações de alguns metais nas ilhas podem estar relacionadas a processos naturais, como as características físico-químicas da água que podem afetar a biodisponibilidade dos metais e as águas de ressurgência que podem chegar a estes locais (BÉRGAMO, 2006). Entretanto, podem também estar relacionadas à atividades antrópicas, como a remobilização de metais provocada pela disposição, próxima à esta região, de material dragado dos portos do Rio de Janeiro e Niterói; o lançamento de efluentes dos emissários submarinos de Ipanema e da Barra da Tijuca, os quais por vezes atingem esta região insular (CARREIRA; WAGENER, 1998; SisBaHiA (anexo 1)); e a exportação das águas da Baía de Guanabara para esta região dependendo das condições de maré e climáticas (BÉRGAMO, 2006). Apesar do Arquipélago das

Cagarras ser uma unidade de conservação estes aportes antrópicos, como a disposição do material dragado e o lançamento dos efluentes dos emissários submarinos, não são devidamente controlados. Em casos como este é importante o estudo do impacto sofrido por estas áreas para que se demonstre a necessidade de medidas de controle dos aportes de metais para o ambiente. A utilização de organismos biomonitores neste local podem ser úteis para o monitoramento da contaminação por metais nesta região insular e na Baía de Guanabara.

1.2 ORGANISMOS MONITORES DE METAIS

Organismos biomonitores da contaminação por metais podem indicar a qualidade do ambiente em que vivem. Estes organismos podem ser utilizados para compreender as variações temporais e geográficas da biodisponibilidade de certos contaminantes (RAINBOW, 2002). O estudo de biomonitores que habitam costões rochosos preenche uma lacuna no que se refere à compreensão da distribuição de contaminantes no ambiente, uma vez que os sedimentos adjacentes a estes ecossistemas são arenosos, não permitindo a adsorção dos contaminantes lançados. Além disso, para compreender a dinâmica dos metais no meio ambiente é importante analisar o comportamento dos diferentes metais nos diversos compartimentos ambientais.

Os mexilhões são amplamente utilizados para o biomonitoramento da contaminação em águas costeiras e para avaliações de risco ambiental, como no programa *Mussel Watch* e diversas pesquisas científicas (CANTILLO, 1998; MANLY et al., 1996; THÉBAULT et al., 2008). Os mexilhões, como o *Perna perna*, são bivalves filtradores sésseis com grande capacidade de acumular metais traço a partir da água do mar ambiente (FRANCIONI et al., 2004; RAINBOW, 1995). Estes organismos podem assimilar metais tanto da fração dissolvida quanto da particulada (material particulado em suspensão) da água do mar (RAINBOW, 1995). *P. perna* apresenta uma ampla distribuição ao longo da região costeira brasileira, assim como nas regiões tropicais e subtropicais da África, no sul da Índia, em Sri Lanka, na costa atlântica da América do Sul, na América do Norte e em algumas ilhas do Caribe (FERNANDES et al., 2008; FRANCIONI et al., 2004). Esta espécie habita, principalmente, costões rochosos na zona entremarés e, em algumas regiões, é parte da dieta das populações locais. Com isso, *P. perna* é frequentemente extraído e comercializado por coletores

independentes, e também cultivado em decorrência de sua grande adaptabilidade (FERNANDES et al., 2008; LAGE; JABLONSKI, 2008). Seu consumo, dependendo dos níveis de contaminantes presentes em seus tecidos, pode oferecer risco a saúde humana. Atualmente, os bioindicadores de contaminação por metais mais utilizados no Brasil são bivalves filtradores, como o *Perna perna* (REZENDE; LACERDA, 1986; CARVALHO et al., 1991, 2001; CARVALHO; LACERDA, 1992; FRANCIONI, 2004; MAIA et al., 2006).

Apesar da importância dos Cnidários nos ambientes costeiros, poucos estudos foram realizados sobre o acúmulo de metais em seus tecidos. Menos ainda foi estudado a respeito da acumulação de metais em anêmonas-do-mar (HARLAND; NGANRO, 1990; MITCHELMORE et al., 2003a, 2003b; MAIN et al., 2010). *Bunodosoma caissarum* é uma espécie endêmica brasileira de anêmona-do-mar, a qual possui uma ampla distribuição ao longo da região costeira brasileira. Esta espécie é sésil e geralmente habita costões rochosos na zona entremarés (RUSSO et al., 1994; AMADO et al., 2011). Organismos desta espécie podem bioacumular Hg a partir da água do mar ambiente (RIZZINI-ANSARI et al., 2015 (ver apêndice)). Esta espécie também é capaz de incorporar em seus tecidos metais como cádmio, cobre e zinco (RIZZINI-ANSARI, 2011). Em estudos utilizando elementos radioativos α -emissores Gouvêa et al. (1985, 1989) demonstraram que *B. caissarum* poderia ser utilizada como bioindicador da contaminação radioativa na água do mar por cromo, cobalto e zinco. *B. caissarum* apresenta estrutura e mecanismos celulares que permitem que organismos desta espécie suportem condições extremas, como a exposição ao ar e a flutuação da salinidade. Esta espécie possui diferentes estratégias de adaptação para lidar com situações de estresse, incluindo a excreção de secreções mucosas, a presença de verrugas e bolhas e o desenvolvimento de um formato de cúpula para proteção (AMADO et al., 2011). *B. caissarum* apresenta uma ampla distribuição na região costeira provavelmente por esta grande adaptabilidade à diversas condições ambientais.

Mexilhões da espécie *Perna perna* são tradicionalmente utilizados como biomonitores para a Baía de Guanabara (CARVALHO et al., 1991; CARVALHO; LACERDA, 1992; COSTA et al., 2000; FRANCIONI et al., 2004; KEHRIG et al., 2002; YOSHIMINE et al., 2012). No entanto, há uma limitação da distribuição de *P. perna*, especialmente na região mais interna da baía, enquanto a anêmona-do-mar da espécie *Bunodosoma caissarum* apresenta uma distribuição mais abrangente na

região (RIZZINI-ANSARI, 2009, 2011). Dada a ampla distribuição de *B. caissarum* na Baía de Guanabara e em outros locais da costa brasileira são levantadas questões sobre as características da bioacumulação de metais nesta espécie e se esta seria um bom biomonitor, alternativo ou complementar, da contaminação por metais em ambientes aquáticos.

1.3 EXPERIMENTOS DE INCUBAÇÃO EM MICROCOSMOS

“Ecosistemas modelo” podem ser uma ferramenta útil para avaliar o destino e as implicações da contaminação por metais em ambientes aquáticos (CORREIA et al., 2012a; TESSIER et al., 2007). Experimentos de incubação utilizando traçadores isotópicos permitem a modelagem de ambientes e de processos que ocorrem na natureza. A partir desse tipo de experimento, é possível investigar a distribuição e o comportamento de metais em diferentes compartimentos ambientais através da construção de um microcosmo (CORREIA et al., 2012a; RIBEIRO GUEVARA et al., 2008, 2007; TESSIER et al., 2007). Experimentos de microcosmos simulam ambientes naturais e podem ser desenvolvidos e, depois, validados para ecossistemas aquáticos reais (MASON et al., 1996; TSENG et al., 2001), podendo dar suporte à avaliação de risco ecotoxicológico (TESSIER et al., 2007).

Os metais Cd e Hg são considerados tóxicos em concentrações relativamente baixas. O Zn é um metal essencial, e encontra-se associado a diferentes enzimas em organismos aquáticos (BOWEN, 1979; LACERDA et al., 1989). No entanto, quando metais, essenciais ou não, estão presentes no ambiente aquático em altas concentrações estes podem torna-se tóxicos e impedir a regulação do nível interno destes pelos organismos (AMIARD et al., 1987). Estes três metais, devido à sua importância ecotoxicológica, foram escolhidos no presente estudo para a realização de experimentos de incubação com *B. caissarum* e *P. perna*. A partir destes estudos pretende-se compreender melhor a distribuição de Cd, Hg e Zn em ambientes com a presença destas espécies e investigar a bioacumulação destes metais. Estes resultados podem dar suporte para a escolha de organismos biomonitores levando em conta situações ambientais diferentes e auxiliar na gestão ambiental de áreas contaminadas ou potencialmente contaminadas. O uso de traçadores isotópicos nestes experimentos oferece vantagens, pois permite distinguir entre o traçador adicionado no experimento e os isótopos anteriormente presentes nas amostras.

A identificação de biomoléculas em amostras biológicas, como as metaloproteínas, e a especiação química de metais traço ligados a estas são meios importantes de se investigar as suas funções biológicas e o seu metabolismo (HARAGUCHI, 2004). Metalotioneínas (MTs) são proteínas de baixo peso molecular que se associam a metais, possuem elevado conteúdo de cisteína e existem na maioria dos eucariotas (AMIARD et al., 2006; GEFFARD et al., 2005). Os grupos tiol (-SH) presentes na cisteína permitem que as MTs se liguem a metais pesados. O estudo de MTs ou proteínas similares às metalotioneínas (PSMTs) como biomarcadores em organismos aquáticos pode auxiliar na avaliação da poluição ambiental em ambientes marinhos (LAVILLA et al., 2012; GEFFARD et al., 2005). A biossíntese de MTs é induzida por determinadas concentrações de metais (AMIARD et al., 2006; GEFFARD et al., 2005; LAVILLA et al., 2012). Nem todas as funções das MTs estão totalmente elucidadas. No entanto, é reconhecido que as proteínas citosólicas estão envolvidas na homeostase de metais essenciais, como o zinco e o cobre, e na detoxificação de metais tóxicos, como o cádmio e o mercúrio (AMIARD et al., 2006; GEFFARD et al., 2005; LAVILLA et al., 2012; NG et al., 2007). Além das MTs, outras proteínas citosólicas, como as proteínas de alto peso molecular (PAPMs) e proteínas de baixo peso molecular (PBPMs), também podem se ligar a metais. A maioria dos estudos com MTs são em bivalves, no entanto outros organismos, como as esponjas, apresentaram PSMTs (BERTHET et al., 2005; WANICK et al., 2013).

1.4 ORGANIZAÇÃO DO PRESENTE ESTUDO

No presente estudo, o radioisótopo ^{203}Hg foi utilizado para investigar a distribuição, metilação, volatilização, bioacumulação e depuração de mercúrio em sistemas modelo de laboratório com e sem a presença de *Bunodosoma caissarum*. Também utilizou-se *spikes* enriquecidos nos isótopos estáveis ^{116}Cd e ^{68}Zn para investigar a incorporação e a distribuição de Cd e Zn em sistemas modelo de laboratório com *Bunodosoma caissarum* ou *Perna perna*, para compreender a especiação destes metais nos organismos e tentar identificar proteínas que se associam a estes nos tecidos de organismos destas espécies. Além disso, o presente estudo aprofunda um estudo anteriormente desenvolvido, no qual realizou-se uma amostragem de espécimes de *B. caissarum*, *P. perna* e material particulado em suspensão na Baía de Guanabara e na região insular adjacente em 2009 e mediu-se

as concentrações de metais nestas amostras (RIZZINI-ANSARI, 2011). Na presente tese será realizada uma comparação das concentrações de metais entre esta amostragem em 2009 e uma nova amostragem realizada em 2013 nas mesmas estações.

Esta tese encontra-se subdividida em capítulos por tema. Após a introdução, há uma breve elucidação teórica sobre os temas que serão abordados, seguida do capítulo a respeito da comparação da concentração de metais em *B. caissarum* e *P. perna* provenientes da Baía de Guanabara e da região insular adjacente entre os anos de 2009 e 2013. O próximo capítulo refere-se à incubação de *B. caissarum* com mercúrio, seguido dos capítulos que tratam dos experimentos de incubação de *B. caissarum* e *P. perna* com cádmio e zinco. A seguir, apresenta-se uma conclusão geral e considerações finais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

- Avaliar a anêmona *Bunodosoma caissarum* como espécie biomonitora da contaminação por metais para a Baía de Guanabara e a região insular adjacente, comparando-a com *Perna perna*, uma espécie de bivalve tradicionalmente utilizada como biomonitora na região.

- Compreender a bioacumulação e a distribuição dos metais cádmio, mercúrio e zinco em microcosmos com a presença de *Bunodosoma caissarum* ou *Perna perna* e avaliar estas espécies como biomonitoras para estes metais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar as concentrações dos metais encontradas nos tecidos de *Bunodosoma caissarum* e *Perna perna* provenientes de diferentes setores da Baía de Guanabara e da região insular adjacente em amostragens realizadas nos anos de 2009 e 2013.

- Estudar a incorporação, a depuração e a especiação de Hg através de incubação com o radioisótopo ^{203}Hg em microcosmos contendo *Bunodosoma caissarum* e também a distribuição deste metal nos diferentes compartimentos dos microcosmos.

- Estudar a bioacumulação de Cd e Zn através de incubações com ^{116}Cd e ^{68}Zn isotopicamente enriquecidos em microcosmos contendo *Bunodosoma caissarum* ou *Perna perna* e também a distribuição destes metais na água do mar dos microcosmos e nos tecidos dos organismos.

- Investigar, separar e identificar metaloproteínas associadas ao Cd e ao Zn nos tecidos dos espécimes de *Bunodosoma caissarum* e *Perna perna* incubados com ^{116}Cd e ^{68}Zn .

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 METAIS E COMPARTIMENTOS AMBIENTAIS

Os metais traço são transportados ao longo do ciclo hidrológico. Neste processo, a água e a atmosfera promovem o intemperismo continental e são o meio de transporte destes metais traço. As fontes de metais podem ser naturais ou antrópicas, a principal fonte natural é o intemperismo de rochas continentais e umas das principais fontes antrópicas são os efluentes industriais e domésticos e a queima de combustíveis fósseis. As principais vias de acesso destes metais para os ambientes marinhos são a descarga fluvial e o transporte atmosférico (SALOMONS; FÖRSTNER, 1984; BELLOTTO; FRANCONI, 2008).

O ambiente aquático pode ser subdividido em cinco compartimentos de metais: o material particulado em suspensão, o sedimento, as águas superficiais, as águas intersticiais e a biota. Estes interagem entre si; por exemplo, entre o material em suspensão e os metais em solução nas águas superficiais, ocorrem processos de adsorção ou desorção e (co-) precipitação. Já o sedimento depositado e o material em suspensão estão interligados por meio de processos como sedimentação e erosão. Além disso, após a deposição, processos de diagênese podem fornecer metais traço às águas intersticiais e através de processos como difusão e bioturbação podem afetar as concentrações de metais das águas superficiais. Estes compartimentos influenciam diretamente na absorção de metais pela biota, dependendo do comportamento e da distribuição das espécies nos ecossistemas aquáticos (SALOMONS; FÖRSTNER, 1984).

Os metais são elementos naturalmente presentes nos ecossistemas. Muitos dos metais presentes nos ambientes aquáticos são essenciais à vida, por exemplo, muitos têm a função de catalisadores bioquímicos. Quando metais essenciais, como o ferro, manganês, cobre e zinco, estão presentes em baixas concentrações no ambiente aquático, estes podem limitar o desenvolvimento dos organismos. Outros metais, como o mercúrio, o cádmio e o chumbo, não são necessários como micronutrientes, nem em pequenas quantidades. Todos os metais, essenciais ou não, podem ser tóxicos dependendo das concentrações incorporadas. A maioria dos metais presentes em níveis tóxicos tem origem nas atividades antrópicas. Os metais

não são biodegradáveis e “percorrem” um ciclo biogeoquímico (LAWS, 1981; NIENCHESKI et al., 2008).

Na água, o material particulado em suspensão é bastante relevante para o transporte de metais (LACERDA et al., 1983; LACERDA; WATTS, 1993) sendo uma das principais fontes de metais para a biota (LACERDA; WATTS, 1993). Os íons metálicos podem se associar à matéria orgânica dissolvida e formar colóides. Estes muitas vezes são adsorvidos ao material particulado em suspensão podendo ser capturados pela biota ou depositados nos sedimentos (CARVALHO et al., 1991).

Os invertebrados marinhos possuem tecidos permeáveis, nos quais ocorre difusão de íons (BOWEN, 1979), como os íons metálicos. Metais essenciais, como o cobre, zinco e manganês, encontram-se ligados a diferentes enzimas no metabolismo de diversos organismos aquáticos (LACERDA et al., 1989), porém quando metais, essenciais ou não, encontram-se em altas concentrações no ambiente, podem tornar-se tóxicos e impedir a regulação do nível interno destes pelos organismos (AMIARD et al., 1987).

Invertebrados marinhos, como os moluscos, têm a capacidade de acumular metais a níveis muito superiores às concentrações encontradas na água do meio que vivem. Assim, em ambientes contaminados, podem ocorrer concentrações acima do nível máximo que pode ser regulado internamente pelo organismo (BOWEN, 1979; AMIARD et al., 1987; RAINBOW, 1995a; FRANCIONI, 1997). Há algumas similaridades na toxicologia de alguns metais. Por exemplo, Hg, Cd e Pb possuem grande afinidade por grupos sulfidríla (-SH) e aparentam exercer efeitos tóxicos com a combinação desses grupos em proteínas. Esta combinação pode interromper processos mediados por enzimas e/ou romper a estrutura celular. As proteínas que são prejudicadas dependem do metal em questão, porém a interação bioquímica responsável pela toxicidade desses metais é a mesma (LAWS, 1981).

De acordo com Carvalho et al. (1991) a concentração total de metais na água, a biodisponibilidade destes e a concentração encontrada nos organismos marinhos dependem de diversos fatores. Estes fatores, que influenciam na concentração de metais nos organismos, dependem do elemento envolvido, da fonte, da carga total de metais e do organismo estudado. Assim, estes fatores combinados podem gerar padrões de distribuição de metais diferentes, dependendo das condições encontradas nos ambientes estudados.

Organismos marinhos filtradores geralmente apresentam os maiores fatores de bioacumulação de metais pesados, devido à ingestão de grandes quantidades de material em suspensão ricos em metais (AMIARD et al., 1987; CARVALHO; LACERDA, 1992).

Com relação à interação entre elementos-traço e maiores e os organismos aquáticos, deve-se considerar a especiação destes elementos no ambiente externo, as suas interações com a “membrana biológica” que separa o organismo do seu ambiente, a partição dos elementos nos organismos (distribuição e afinidades nos seus tecidos) e seus efeitos biológicos. A medição da concentração de compostos químicos presentes na água não é suficiente para se prever a biodisponibilidade total dos elementos. A especiação de metais, por exemplo, tem grande efeito sobre a disponibilidade destes compostos para os organismos aquáticos (CAMPBELL, 1995). Em ambientes aquáticos geralmente a biodisponibilidade está relacionada à concentração de metais livres, pois os íons livres são comumente a forma de metal dissolvido mais biodisponível (PEAKALL; BURGUER, 2003). No entanto, há exceções como os clorocomplexos de Hg, os quais são fortemente lipofílicos e mais facilmente incorporados do que o Hg^{2+} (SIMKISS, 1983). Os clorocomplexos de Cd também apresentam o mesmo comportamento em águas salinas apresentando maior biodisponibilidade que outras espécies de Cd (WAELES et al., 2009). Pode-se medir ou calcular a biodisponibilidade por meio de diversos métodos, como em experimentos em laboratório e em campo observando-se as concentrações de metais em diferentes organismos de diferentes níveis tróficos e em diferentes partes da cadeia trófica. O conceito de biodisponibilidade inclui a disponibilidade de metais aos organismos, assim como a disponibilidade de metais aos tecidos dos organismos uma vez que incorporados (PEAKALL; BURGUER, 2003).

Determinar a concentração de elementos-traço nos compartimentos ambientais água e sedimento é muito importante para a caracterização da contaminação, porém também é importante saber o nível de contaminantes incorporado pela biota. A determinação das concentrações de metais em tecidos de organismos pode auxiliar na identificação de áreas impactadas e/ou contaminadas. Neste sentido, em estudos de monitoramento da contaminação por metais, é importante o uso de organismos biomonitores que reflitam a qualidade ambiental do

ecossistema em que vivem. A seguir serão mencionadas características que devem ser levadas em consideração para a escolha de espécies biomonitoras de metais.

3.2 ORGANISMOS BIOMONITORES DE METAIS-TRAÇO

Todos os invertebrados aquáticos são capazes de bioacumular metais essenciais e não essenciais em seus tecidos. Organismos biomonitoras são capazes de indicar a qualidade ambiental dos ecossistemas em que vivem. Estes organismos têm a capacidade de acumular contaminantes em seus tecidos em quantidades proporcionais às concentrações encontradas no ambiente (COSSA, 1989; FRANCONI, 1997; RAINBOW, 2002).

Os organismos biomonitoras acumulam metais pesados em seus tecidos e podem ser utilizados para se conhecer as variações geográficas e temporais da biodisponibilidade de metais no ambiente. Assim, proporcionam a medição em tempo integrado das cargas de metais que são de relevância ecotoxicológica direta (RAINBOW, 1995a; 2002). Para este autor o termo biomonitor é mais correto, pois seu uso é relativamente específico. Este termo é frequentemente utilizado para mostrar alterações ecológicas por meio de mudanças comportamentais, fisiológicas ou, por exemplo, nas taxas respiratórias dos organismos (RAINBOW, 1995a). Já o termo bioindicador pode ser aplicado em diversos casos, como para organismos que denotam algum efeito ecológico através da sua presença ou ausência no ambiente.

Cada organismo reage a presença de contaminantes no ambiente de forma diferente. As algas, por exemplo, respondem principalmente às frações dissolvidas de metais; os filtradores, como os mexilhões, respondem às frações tanto na fase dissolvida, quanto na particulada e os organismos detritívoros respondem aos contaminantes disponíveis nos sedimentos. Deste modo, o uso de um maior número de espécies biomonitoras permite reconhecer a presença e a magnitude relativa de diferentes fontes de contaminantes (RAINBOW, 1995a).

Algumas características ideais para que uma espécie marinha seja considerada um bom biomonitor da contaminação por metais são: (a) que esta acumule o contaminante sem ser afetado pelos níveis encontrados; (b) que seja sedentário para que reflita a situação da área de amostragem; (c) que seja abundante; (d) que viva o suficiente para permitir a amostragem; (e) que tenha um tamanho

razoável para a análise adequada do tecido; (f) que seja fácil de amostrar e resistente o suficiente para sobreviver o tempo necessário no laboratório; (g) que seja tolerante a grandes variações de salinidade (eurihalinos); (h) que apresente fatores de concentração elevados; (i) que se conheça a relação entre os contaminantes presentes nos tecidos e a concentração na água do mar do local a ser estudado; (j) que esteja presente ao longo de todo o ano e; (k) apresente ampla distribuição geográfica (REZENDE; LACERDA, 1986; COSSA, 1989; RAINBOW; PHILIPS, 1993; PNUE, 1994; FRANCONI, 1997).

As características mais difíceis de serem encontradas em somente uma espécie são que a espécie apresente ampla distribuição geográfica, que esteja presente durante o ano todo e o conhecimento dos fatores de bioconcentração dos contaminantes na espécie. Por fator de bioconcentração, considera-se a relação entre a concentração do metal nos tecidos do organismo e a concentração deste metal na água onde vivem.

Em áreas impactadas não é fácil encontrar um organismo que possua todas essas características. Isto se dá porque ambientes impactados estressam a grande maioria dos indivíduos, o que pode levar à perda das populações. Muitos organismos apresentam grande variabilidade genética, e poucos são biomonitores, ou seja, apresentam uma relação direta entre as concentrações dos poluentes no meio e no organismo. Assim, é difícil que haja grande disponibilidade de populações para amostragens em ambientes alterados. Atualmente, os organismos biomonitores mais utilizados no Brasil são bivalves filtradores, como o mexilhão *Perna perna* ou a ostra *Crassostrea brasiliiana* (REZENDE; LACERDA, 1986; CARVALHO et al., 1991; CARVALHO; LACERDA, 1992; FRANCONI et al., 2004; WANICK, 2007).

A bioacumulação de elementos-traço foi estudada em diversos grupos taxonômicos na Baía de Guanabara, como algas, poríferos, crustáceos, moluscos, peixes e mamíferos. Dentre estas, o molusco bivalve *Perna perna* foi a espécie mais estudada na região e também a espécie na qual se determinou o maior número de elementos (CARVALHO et al., 1991; CARVALHO; LACERDA, 1992; COSTA et al., 2000; FRANCONI et al., 2004; KEHRIG et al., 2002; RIZZINI-ANSARI, 2011; YOSHIMINE et al., 2012).

Segundo Francioni (1997) a superioridade do mexilhão *Perna perna* como bioindicador foi constatada por diversos autores. Isto se deve ao fato destes bivalves terem grande distribuição por todo o litoral do Estado do Rio de Janeiro, serem

sésseis, fáceis de serem coletados, apresentarem tamanho razoável (sendo o maior dos mitilídeos brasileiros), serem capazes de acumular metais do ambiente em que vivem com um fator de concentração de cerca de 10^3 a 10^5 , serem relativamente resistentes a poluição, serem eurihalinos (sendo capazes de viver numa faixa de salinidade de 11 a 44 ppm), sua biologia e ecologia serem bem conhecidas e possuírem importância econômica e ecotoxicológica, pois são também utilizados para o consumo humano.

Escolheu-se a espécie de anêmona *Bunodosoma caissarum* para o presente estudo, pois esta apresenta uma ampla distribuição no litoral da cidade do Rio de Janeiro, grande tolerância a ambientes com grandes aportes antropogênicos, é sedentária, relativamente fácil de amostrar, sobrevive à amostragem e à mudança de ambiente (sobrevive em laboratório), dispõe de um tamanho razoável e é tolerante a grandes variações de salinidade. De acordo com Amado (2006), *Bunodosoma caissarum* apresenta capacidade de osmorregular sob estresse hiposmótico, o que pode permitir a essa espécie uma maior tolerância à diluição quando comparada à outras espécies de anêmonas-do-mar, como a *Actinia bermudensis*. Para a autora esta observação está de acordo com a distribuição das espécies no costão rochoso, já que *B. caissarum* apresenta uma ampla distribuição, inclusive em regiões que ficam expostas durante a maré baixa, enquanto a outra se limita às regiões que nunca ficam descobertas pela água. Carvalho e Lacerda (1992) encontraram *B. caissarum* em todos os pontos de amostragem de seu estudo na Baía de Guanabara, o mesmo não ocorreu para as outras espécies estudadas.

3.3 A ANÊMOMA-DO-MAR *BUNODOSOMA CAISSARUM*

As anêmonas-do-mar são cnidários pertencentes à classe Anthozoa. São membros desta classe também os corais, as gorgônias e as renilas. Anthozoa é a maior classe dos cnidários, contendo mais de 6000 espécies. Os antozoários são cnidários polipóides ou coloniais, nos quais o estágio medusóide está completamente ausente (BARNES, 1990).

As anêmonas são organismos exclusivamente marinhos que contêm toxinas liberadas por organelas especializadas, conhecidas como nematocistos. Estes são localizados ao longo dos tentáculos e de seu corpo e são empregados na defesa contra predadores e na captura de suas presas (OLIVEIRA et al., 2006). As

anêmonas-do-mar se alimentam de vários invertebrados, sendo que as maiores espécies podem capturar peixes. A presa é paralisada pelos nematocistos, agarrada pelos tentáculos e levada à boca. A boca é aberta por músculos mesentéricos radiais e assim a presa é engolida (BARNES, 1990).

A espécie de anêmona-do-mar que será estudada nesta tese é *Bunodosoma caissarum* (Côrrea, 1964). *Bunodosoma caissarum* (Figura 1) é uma espécie endêmica do Brasil. Esta anêmona pertence ao Filo Cnidaria, Classe Anthozoa, Ordem Actiniaria, Família Actiniidae e Gênero *Bunodosoma*.



Figura 1 - Anêmona *Bunodosoma caissarum*.

B. caissarum é uma espécie sésil, que geralmente habita costões rochosos na zona entremarés e que pode ser encontrada exposta ao ar durante a maré baixa ou em poças de maré (AMADO et al., 2011; RUSSO et al., 1994). Esta espécie apresenta adaptações morfológicas e comportamentais, aliadas a mecanismos celulares de regulação do volume celular, que possibilitam sua sobrevivência na zona entremarés. Estas adaptações incluem a secreção de muco, o qual previne a perda de hidratação, a transformação corporal para um formato de domo ou cúpula para proteção, que reduz a área de contato com o meio, além da presença de verrugas e bolhas. Estas verrugas são adesivas e geralmente aumentam de tamanho quando expostas ao ar e podem reter partículas de maneira a formar uma barreira protetora para a diminuição da perda de água (AMADO et al., 2011).

As anêmonas-do-mar da espécie *B. caissarum* são fortemente adesivas, possuem uma base bem desenvolvida (circular ou lobada) e se expandem bastante

ao se fixar a um substrato. Esta espécie apresenta diâmetros altamente variáveis, atingindo 6,0 centímetros. Sua base possui coloração bege clara, com linhas de inserção de mesentério marrom avermelhado, vinho ou lilás. A sua coluna é cilíndrica, levemente expandida na base. Quando distendida, lembra uma palmeira e quando contraída possui a forma de um domo. Sua coluna é totalmente coberta por vesículas endocélicas em séries longitudinais compactas, variando em tamanho e forma de acordo com o grau de contração. A coloração mais comum apresentada por *B. caissarum* é vinho-marrom escuro, com vesículas com um tom mais para um vinho avermelhado. Excepcionalmente, espécimes da Baía de Guanabara podem apresentar colunas de coloração roxa com vesículas de um tom vinho bem escuro ou colunas de cor lilás com vesículas de cor vinho avermelhada (BELÉM, 1988).

Indivíduos desta espécie apresentam grandes quantidades de água em seus tecidos, aproximadamente $75,9 \pm 1,1\%$ (AMADO et al., 2011). A altura de *B. caissarum* pode variar de 1,0 a 8,0 cm e seu diâmetro de 0,5 a 6,0 cm. Quando vivos os espécimes geralmente apresentam um diâmetro entre 1,5 e 3,5 cm e uma altura até 4,0 cm. *B. caissarum* tem 192 tentáculos, que variam em comprimento, porém são normalmente curtos e praticamente apresentam o mesmo tamanho em qualquer indivíduo. Quando totalmente estendidos, podem chegar a mais ou menos 2 cm. Os tentáculos possuem coloração comumente de cor vinho ou, mais raramente, de um tom marrom. A coluna de *B. caissarum* apresenta músculos circulares bem desenvolvidos. Em seu topo há um forte esfíncter e um disco oral com músculos ectodérmicos radiais e músculos endodérmicos circulares. Seus tentáculos têm músculos longitudinais ectodérmicos e seus músculos basais são também bem desenvolvidos. A anêmona *B. caissarum* é uma espécie gonocórica com dimorfismo sexual. Suas gônadas se desenvolvem ao longo dos mesentérios e estão sempre localizadas no trato cnido-glandular entre o músculo retrator e o filamento, limitadas em ambos os lados por músculos acessórios (BELÉM, 1988).

Esta espécie possui ampla distribuição geográfica na região costeira brasileira (AMADO et al., 2011; BELÉM, 1988; RUSSO et al., 1994). Esta pode ser encontrada em grande densidade da costa sul do Espírito Santo à costa do Rio Grande do Sul. Nesta região, os espécimes encontram-se em substrato consolidado na zona infralitoral ao longo de linhas de costa mais expostas ou especialmente em baías protegidas e enseadas na zona mesolitoral, onde podem ocorrer em substratos semi-consolidados. No Arquipélago de Fernando de Noronha, ela é encontrada em grande

densidade na zona mesolitoral, dentro de cavernas marinhas e raramente em poças de maré. E, na Ilha de Trindade, pode ser encontrada em poças de maré de substrato rochoso (BELÉM, 1988).

Esta anêmona tem hábitos carnívoros e produz uma variedade de compostos biológicos. Recentemente, foi descoberto que ela produz uma toxina hemolítica, chamada Caissarolysin I. Ela também produz neurotoxinas capazes de matar caranguejos e ratos (OLIVEIRA et al., 2006a, 2006b).

Apesar da importância dos cnidários nos ambientes costeiros, foram realizados poucos estudos sobre o acúmulo de metais em seus tecidos. Menos ainda foi estudado a respeito da acumulação de metais em anêmonas-do-mar (MITCHELMORE et al., 2003a, 2003b). Harland e Nganro (1990); e Main et al. (2010) fizeram bioensaios com o objetivo de compreender a absorção de cobre por *Anemonia viridis* e *Aiptasia pallida*. Mitchelmore et al. (2003a, 2003b) realizaram pesquisas sobre a acumulação de cádmio, cobre, níquel e zinco em *Anthopleura elegantíssima*. As conclusões de Main et al. (2010) foram que *Aiptasia pallida* acumula cobre e que é possível se detectar a presença de efeitos biológicos nos organismos, a medida que se aumenta as concentrações de cobre. Assim, concluíram que esta espécie poderia ser utilizada como biomonitor de ambientes contaminados por cobre.

B. caissarum foi pouco estudada como espécie biomonitora. Os únicos estudos relativos à acumulação de mercúrio em anêmonas-do-mar encontrados são os efetuados por Rizzini-Ansari et al. (2015) e Rizzini-Ansari (2009). Neste último estudo, foram determinadas as concentrações de mercúrio nos tecidos de indivíduos da espécie de anêmona *Bunodosoma caissarum* e também da espécie de mexilhão *Perna perna* na Baía de Guanabara. Foram observadas concentrações deste metal que não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as espécies estudadas. Estes resultados poderiam indicar um similar potencial para o uso destas espécies como biomonitoras. Rizzini-Ansari (2011) determinou as concentrações dos metais Al, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Ti, V e Zn em *B. caissarum* e *P. perna* provenientes da Baía de Guanabara e da região insular adjacente, anteriormente escolhida como área controle para o estudo. No entanto, as concentrações de Cd se apresentaram mais altas nas ilhas estudadas em ambas as espécies, somente para *B. caissarum* o Ba se mostrou mais alto nas ilhas e somente para *P. perna* o V foi mais alto nesta região insular. Carvalho et al. (1991); Carvalho e Lacerda (1992) determinaram as concentrações de Cd, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn em espécimes de *B. caissarum*

provenientes de algumas estações na Baía de Guanabara. Carvalho et al. (1991) amostraram diversos organismos aquáticos na baía e a única espécie que foi encontrada em todas as estações de amostragem foi *B. caissarum*.

Gouvêa et al. (1985) estudaram as cinéticas de contaminação e descontaminação dos radionuclídeos ^{137}Cs , ^{131}I , ^{133}Ba , ^{51}Cr (III e VI), ^{60}Co e ^{65}Zn em *Bunodosoma caissarum*. Foram realizadas incubações em aquários e os resultados demonstraram que esta espécie pode ser aplicada como bioindicador da contaminação radioativa marinha, principalmente para ^{51}Cr , ^{65}Zn e ^{60}Co , devido aos elevados fatores de concentração observados.

Além de ser reconhecida como um sensível bioindicador de poluição artificial radioativa, *Bunodosoma caissarum* também apresenta uma grande capacidade de concentração de elementos α -emissores (GOUVEA et al., 1989). Os elementos ^{210}Po e seu precursor ^{210}Pb foram medidos em exemplares desta espécie provenientes das praias de Boa Viagem e Ponta Negra, Rio de Janeiro. Os resultados mostraram que esta espécie bioacumula significativamente estes elementos α -emissores, principalmente os espécimes oriundos de Ponta Negra, que apresentaram concentrações mais elevadas. Para estes autores a absorção de radionuclídeos por esta anêmona ocorre mais provavelmente a partir do material particulado e da alimentação.

3.4 O MEXILHÃO *PERNA PERNA*

Os mexilhões são moluscos pertencentes à classe Bivalvia. Organismos desta classe são achatados lateralmente; possuem duas valvas articuladas em conjunto por ligamentos elásticos; suas conchas são fechadas por músculos adutores; possuem cabeça rudimentar que não tem nem olhos nem rádula; pés comprimidos lateralmente; um par de ctenídeos usados conjuntamente com os palpos labiais na alimentação ciliar; grande cavidade do manto; e um par de nefrídeos. Os bivalves são moluscos marinhos ou de água doce que são micrófagos ou filtradores. Esta classe inclui 20.000 espécies representadas em todas as profundidades e ambientes marinhos (BRUSCA; BRUSCA, 2003).

O termo mexilhão é utilizado para denominar os organismos das espécies de moluscos bivalves da família Mytilidae. *Mytilus*, *Perna* e *Mytella* são os gêneros mais

comumente encontrados desta família (JORGE et al., 2002). Organismos da família Mytilidae são muito utilizados em programas de monitoramento ambiental. Há uma vasta literatura a respeito destes organismos como monitores, principalmente em países de clima temperado (AMIARD et al., 1987; COIMBRA; CARRAÇA, 1990; MANLY et al., 1996). Na Baía de Guanabara, o *Perna perna* L. é um dos mitilídeos mais abundantes, além de possuir a capacidade de refletir o grau de contaminação ambiental por metais pesados (REZENDE; LACERDA, 1986). Por esse motivo e por apresentar as características necessárias para ser um bom biomonitor, este organismo foi escolhido como um dos objetos de análise no presente estudo.

A espécie de bivalve que estudada nesta tese é *Perna perna* (Linné, 1758) (Figura 2). Esta espécie pertence ao Filo Mollusca, Classe Bivalvia Linné, 1758, Ordem Mytiloida Férursac, 1822, Família Mytilidae Rafinesque, 1815 e Gênero *Perna* Retzius, 1788.



Figura 2 - Mexilhão *Perna perna*.

P. perna é uma espécie nativa do continente africano. Esta espécie apresenta grande tolerância às variações das características ambientais, como temperatura e salinidade. Esta capacidade de adaptação às diversas condições do ambiente contribuiu para que sua distribuição geográfica se ampliasse bastante. Sua expansão e distribuição deveram-se principalmente à causas antrópicas não-intencionais, como por exemplo o casco de navios e a água de lastro foram muitas vezes vetores de dispersão da espécie. Além das regiões tropicais e subtropicais da África, atualmente esta espécie é encontrada no sul da Índia, no Sri Lanka, na costa atlântica da América do Sul, na América do Norte e em algumas ilhas do Caribe (FERNANDES et al., 2008; FRANCONI et al., 2004).

P. perna é uma espécie exótica na América do Sul, entretanto está completamente estabelecida há mais de 200 anos. Estes organismos são abundantes no litoral brasileiro. São encontrados, principalmente, aderidos a substratos rochosos entre as zonas entremarés e início da zona infralitoral. As profundidades em que são encontrados variam de acordo com a inclinação do costão rochoso, com a intensidade do batimento das ondas e a proximidade do fundo arenoso, podendo chegar a 7 metros (FERNANDES et al., 2008). Áreas mais profundas e com maior ação das ondas podem apresentar mexilhões em profundidades ainda maiores. A fixação de indivíduos desta espécie é realizada através do bisso, estes são filamentos produzidos por uma glândula próxima ao pé deste organismo. *Perna perna* é utilizado como fonte de alimento em diversas regiões e representa fonte de renda para uma porção da população que vive nas zonas costeiras. Cada vez mais cresce o investimento em cultivos deste organismo, pois este possui grande capacidade de adaptação ao cultivo em viveiros artificiais (JORGE et al., 2002; FERNANDES et al., 2008). No entanto, seu consumo pode oferecer risco à saúde humana se os níveis de contaminantes em seus tecidos estiverem acima dos limites permitidos para o consumo.

Estes organismos são filtradores. Em sua alimentação, o material particulado em suspensão é selecionado e capturado pelos cílios das brânquias. Para partículas de tamanho superior a 4 mm a eficiência de retenção pelas brânquias é de 100%. Pode haver uma capacidade maior ainda de retenção de partículas menores, pois estes organismos produzem muco e absorvem diretamente açúcares e aminoácidos livres pelas brânquias. As partículas são encaminhadas para a boca e palpos labiais, onde ocorre a seleção das partículas alimentares. Caso estas partículas estejam em altas concentrações ou com grande quantidade de matéria orgânica, ocorre uma rejeição destas por muco na forma de pseudofeces que são expelidas pela cavidade do manto. As partículas são digeridas de forma intra ou extracelular. A primeira ocorre nos túbulos digestivos da glândula digestiva. A digestão extracelular ocorre a partir da ação de enzimas digestivas que digerem diversos compostos e organismos. Esta digestão ocorre no estômago, no qual há atuação mecânica e enzimática pelo cristalino. A compactação, digestão e absorção do resto alimentar ocorrem no intestino médio e superior e as perdas metabólicas e fezes são excretadas pelo ânus (RESGALLA JR., 2008).

Nessa espécie a absorção de metais pode se dar através das brânquias, do sistema digestivo ou então pelo manto (FRANCIONI, 1997). Estes organismos podem

assimilar metais tanto na fase dissolvida, quanto na fase particulada (RAINBOW, 1995a).

Os mexilhões do gênero *Perna* estão entre os biomonitoros cosmopolitas melhor estudados (RAINBOW; PHILLIPS, 1993). *P. perna* é comumente estudado como espécie biomonitora na África do Sul (ANANDRAJ et al., 2002; GREGORY et al., 2002) e no Brasil, havendo diversos estudos na Baía de Guanabara (CARVALHO et al., 1991; CARVALHO; LACERDA, 1992; COSTA et al., 2000; FRANCONI et al., 2004; KEHRIG et al., 2002; REZENDE; LACERDA, 1986; YOSHIMINE et al., 2012).

4 DISTRIBUIÇÃO DE METAIS NA BAÍA DE GUANABARA E REGIÃO INSULAR ADJACENTE

4.1 INTRODUÇÃO

O biomonitoramento da contaminação por metais utilizando organismos invertebrados marinhos foi mais estudado em países temperados, desta forma conhece-se mais a respeito do potencial das espécies temperadas para este tipo de monitoramento e de suas características de bioacumulação do que a respeito das espécies tropicais. Assim, há uma demanda maior em países tropicais de estudos que analisem o potencial de espécies para o biomonitoramento de metais.

Como citado anteriormente, o mexilhão *Perna perna* é tradicionalmente utilizado para estudos de biomonitoramento na Baía de Guanabara. No entanto, a anêmona-do-mar *Bunodosoma caissarum* apresenta uma distribuição mais ampla que a do *Perna perna* nesta baía (RIZZINI-ANSARI, 2009, 2011). Rizzini-Ansari (2009) encontrou espécimes de *B. caissarum* em todas as estações propostas para o estudo, inclusive no setor mais interno da baía, porém *P. perna* não foi encontrado nos pontos de amostragem mais internos, os quais foram a Ilha do Governador e a Ilha de Paquetá. Rizzini-Ansari (2011) também não encontrou *P. perna* nos dois pontos mais internos na Baía de Guanabara, sendo eles o pilar 102 da Ponte Rio-Niterói e a Ilha do Governador. Entretanto, espécimes de *P. perna* podem ser encontrados na Ponte Rio-Niterói (FRANCIONI et al., 2004; RIZZINI-ANSARI, 2009), apesar de não serem encontrados em todos os pilares, pois muitas vezes estes são coletados para o consumo. Francioni et al. (2004) sugeriu que *P. perna* não é mais encontrado próximo às principais fontes industriais. Estas fontes estão concentradas principalmente na parte interna na baía, particularmente na porção noroeste (BAPTISTA NETO et al., 2006; CARREIRA et al., 2004; KJERFVE et al., 1997; MACHADO et al., 2004). Segundo Francioni et al. (2004), a distribuição de *P. perna* ocorre somente até as regiões mais aeradas, como a Ponte Rio-Niterói e a entrada da baía. Por meio dos estudos anteriores citados acima, observou-se que *B. caissarum* apresenta maior tolerância às condições de eutrofização presentes no setor interno da Baía de Guanabara do que *P. perna*, pois foi encontrada facilmente na região interna da Baía de Guanabara.

Por apresentar uma distribuição mais abrangente na baía, *B. caissarum* apresenta potencial para ser utilizada como um biomonitor alternativo ao *P. perna* em locais onde este não ocorre e como biomonitor complementar nos locais onde ambas as espécies coexistem. Além disso, há uma carência de estudos de biomonitoramento com invertebrados que utilizem mais de uma espécie. Este tipo de estudo utilizando duas ou mais espécies de organismos invertebrados enriquece o monitoramento da contaminação por metais, pois cada espécie responde às flutuações das concentrações no ambiente de maneira diferente. Por exemplo, algumas espécies respondem melhor a eventos de contaminação agudos, outras à contaminação crônica e outras à fontes intermitentes. Assim, o uso de diferentes espécies pode auxiliar estudos de monitoramento nos quais ocorre diferentes formas de contaminação por metais. *B. caissarum* poderia ser uma potencial espécie biomonitora para este tipo de estudo desde que se estude melhor sua incorporação de metais.

No estudo de Rizzini-Ansari (2011), no qual se realizou uma amostragem em 2009 de espécimes de *P. perna* e *B. caissarum* provenientes da Baía de Guanabara e da região insular adjacente, esta região insular havia sido inicialmente escolhida como área controle. No entanto, o setor insular adjacente à Baía de Guanabara não apresentou características de uma área com pouca influência antrópica. Pelo contrário, em algumas situações, encontrou-se concentrações de metais maiores ou próximas às encontradas no setor interno da baía. Estas maiores concentrações de metais encontradas para o setor insular adjacente à Baía de Guanabara sugeriram que esta região pode sofrer influência das águas da baía, do lançamento de efluentes dos emissários submarinos de Ipanema e da Barra da Tijuca, dentre outras possibilidades que serão comentadas a seguir no ítem sobre a área de trabalho.

Este capítulo pretende comparar as concentrações de metais nos tecidos de *P. perna* e *B. caissarum* provenientes da Baía de Guanabara e da região insular adjacente amostrados em 2009 e em 2013 e avaliar estas espécies como biomonitoras para a área estudada.

4.2 ÁREA DE TRABALHO

A área de estudo foi a Baía de Guanabara, localizada no Estado do Rio de Janeiro, Brasil, entre as coordenadas 22°40' e 23°00' Sul e 43°00' e 43°18' Oeste e em pontos externos próximos a baía, o Arquipélago das Cagarras e as ilhas Redonda e Rasa. A Baía de Guanabara ocupa uma área de aproximadamente 380 km² e tem um perímetro de 131 km, 80% de sua área apresentam profundidades de menos de 10 m. A baía é considerada um estuário, localizado na região metropolitana do Rio de Janeiro. Sua entrada é relativamente estreita, com largura de aproximadamente 1,6 km (DE LUCA REBELLO et al., 1986; KJERFVE et al., 1997).

A bacia de drenagem da baía tem área aproximada de 4080 km², englobando total ou parcialmente 16 municípios. Os municípios parcialmente incluídos são: Rio de Janeiro, Niterói, Nova Iguaçu, Rio Bonito, Cachoeira de Macacú e Petrópolis. E os que se incluem inteiramente na bacia de drenagem da baía são: Nilópolis, São João de Meriti, Mesquita, Belford Roxo, Duque de Caxias, Guapimirim, Magé, Itaboraí, Tanguá e São Gonçalo. A bacia de drenagem da baía é formada por 90 rios e canais. A Baía de Guanabara abriga dois portos, o do Rio de Janeiro e o de Niterói. A região portuária da baía é continuamente dragada para a manutenção de profundidades que permitam o tráfego de navios (KJERFVE et al., 1997; COELHO, 2007; WAGENER et al., 2012).

A entrada da Baía de Guanabara possui 1,6 km de largura, permitindo trocas com a água do mar por meio da maré. Seu canal central possui mais de 5 km de extensão, desde a entrada da baía até sua parte interna, 400 m de largura e possui uma profundidade média de 30 m. Esta baía recebe aproximadamente 150 m³.s⁻¹ de águas provenientes dos rios presentes na sua bacia de drenagem. O tempo de renovação de 50% do volume total das águas da baía é de 11,4 dias (KJERFVE et al., 1997; PERIN et al., 1997; FRANCONI, 2001; WAGENER et al., 2012).

A bacia de drenagem da Baía de Guanabara possui um histórico de crescente industrialização e urbanização (COELHO, 2007). As alterações na sua bacia de drenagem, as quais iniciaram-se no começo do século XIX e aumentaram nos últimos 40-50 anos, causaram diversos problemas ambientais para a baía (FONSECA et al., 2009; KALAS et al., 2009). A Baía de Guanabara, por ser um estuário, acaba por se tornar um reservatório de contaminantes provenientes principalmente de rios que desaguam nesta. Dentre as diversas fontes de contaminantes para a baía estão o

escoamento urbano e agrícola, a deposição atmosférica e o descarte de efluentes domésticos e industriais não tratados, assim como a presença de refinarias, de atividades navais (docas, marinas, portos e intenso tráfego naval) e a ocorrência de derramamentos de óleo (KJERFVE et al., 1997; FERNANDEZ et al., 2005; BAPTISTA NETO et al., 2005, 2006; FARIAS et al., 2008; FONSECA et al., 2009). Diversos estudos ambientais na baía mostraram a presença de contaminantes nos sedimentos, na água e nos organismos da Baía de Guanabara, como metais pesados e hidrocarbonetos (KEHRIG et al., 2003; CARREIRA et al., 2004; FRANCONI et al., 2004; 2007; BAPTISTA NETO et al., 2005, 2006; CORDEIRO et al., 2008; DONNICI et al., 2012).

As principais consequências desta degradação foram a eutrofização, as altas taxas de sedimentação, as elevadas concentrações de metais e hidrocarbonetos nos sedimentos e as mudanças na comunidade bentônica e pelágica (CARREIRA, 2000; CARREIRA et al., 2002). Carreira et al. (2002) encontraram um aumento significativo do fluxo de carbono para a Baía de Guanabara em relação aos últimos 100 anos. Este aumento da estocagem de carbono orgânico total (COT) ocorre principalmente devido às altas taxas de sedimentação, à grande disponibilidade de material orgânico proveniente de efluentes urbanos e às condições eutróficas da baía.

As águas da baía possuem uma alta produtividade. De Luca Rebello et al. (1986) encontraram uma supersaturação de oxigênio nas águas superficiais, chegando a 300%. Os autores observaram uma média de 70-80 mg/L de material particulado em suspensão, 40 a 100% destes eram orgânicos. O carbono orgânico dissolvido (COD) encontrado foi acima de 11 mg/L para todas as amostras com salinidades acima de 9.

Segundo Perin et al. (1997), a Baía de Guanabara é um ambiente estressado, onde o baixo nível de oxigênio no sedimento de fundo causa uma forte redução do sulfato da água do mar, gerando uma alta produção de sulfeto de hidrogênio. Este último, juntamente com os ácidos húmicos, é responsável por regular a quantidade de metais biodisponíveis, e assim a troca metais-biota-água.

O comportamento e a toxicidade de metais nos sedimentos de ambientes anóxicos ou parcialmente anóxicos, como a Baía de Guanabara, são influenciados pela presença de sulfetos de ferro. Estes contribuem para a formação e preservação de sulfetos metálicos (MACHADO et al., 2004). Machado et al. (2004) encontraram de moderadas a altas concentrações de sulfetos ácido-voláteis (AVS) nos sedimentos da

Baía de Guanabara, provenientes do sistema estuarino do Rio Iguaçu. Os metais Cu, Cd, Ni e Pb, em geral, apresentaram forte associação com o AVS e o Fe nos sedimentos da baía.

A região noroeste da Baía de Guanabara é a área onde se encontra maior concentração de metais pesados no sedimento (DE LUCA REBELLO et al., 1986). Os rios Estrela e Iguaçu foram identificados por estes autores, respectivamente, como fontes de cobre e cromo. Altas concentrações de cobre e cromo somente foram encontradas em um raio de 6 a 7 km da fonte pontual, fora deste limite as concentrações de cobre foram nitidamente menores. Os autores observaram uma rápida remoção de ambos os metais para o sedimento neste ambiente estuarino rico em COD. As maiores concentrações de metais pesados no sedimento se encontram na região interna da Baía de Guanabara, Baptista Neto et al. (2006) encontrou altas concentrações de cobre na área portuária da baía.

O Arquipélago das Cagarras, setor externo da Baía de Guanabara, localiza-se a 8 km de distância da entrada da baía (Figura 6, a seguir) e a cerca de 5 km ao sul da praia de Ipanema. Este é composto pelas ilhas Cagarra, Laje e Filhote da Cagarra, Matias, Praça Onze, Comprida e Palmas. O Arquipélago das Cagarras e a Ilha Redonda tornaram-se, em abril de 2010, uma unidade de conservação marinha denominada Monumento Natural das Ilhas Cagarras (MORAES et al., 2013). Próximo a este arquipélago, encontra-se a Ilha Rasa. Todas estas ilhas estão localizadas no Oceano atlântico e situam-se ao largo da cidade do Rio de Janeiro. Deste modo, sofrem influência de águas oceânicas, de efluentes urbanos lançados pelo emissário submarino de Ipanema (CARREIRA; WAGENER, 1998; MORAES et al., 2013; SisBaHiA (Anexo 1)), das águas da Baía de Guanabara que podem chegar a esta região (BÉRGAMOS, 2006; MORAES et al., 2013; SisBaHiA) e da presença de intenso tráfego de embarcações de médio e pequeno porte na região (MORAES et al., 2013). Além disso, a Companhia Docas realiza dragagens rotineiras que despejam o sedimento coletado nos portos do Rio de Janeiro e de Niterói em locais próximos à Ilha de Cotunduba e à Ilha do Pai, região próxima a entrada da baía. Estes pontos de disposição do material dragado, denominados “bota-fora”, têm mudado de localidade ao longo dos anos, porém continuam sendo próximos à esta região podendo influenciar também. Em processos de dragagem, os contaminantes podem ser remobilizados, retornando aos corpos de água, e podem tornar-se biodisponíveis (SILVA, 2003b). Um dos setores de dragagem mais atuais (Figura 3) se situa

relativamente próximo às ilhas que compõem a unidade de conservação, podendo influenciar suas águas e aumentar as concentrações de metais na região. Um dos pontos de disposição, atualmente desativado, se situava a menos de 10 km de distância da unidade de conservação.

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1 Amostragem

A amostragem do presente estudo foi realizada no dia 22 de fevereiro de 2013. Esta teve início em regime de maré vazante. Os pontos de amostragem foram ao todo seis: Ilha Rasa, Ilha Redonda, Ilha Comprida, Cotunduba, Forte da Lage e Pilar da Ponte Rio – Niterói (Figura 3). Os dados desta amostragem foram comparados com dados obtidos em uma amostragem realizada em 9 de setembro de 2009 em regime de maré vazante nos mesmos pontos, porém na amostragem de 2009 houve uma estação a mais, localizada na Ilha do Governador (Figura 3).

A amostragem dos indivíduos foi realizada através de mergulho livre e autônomo, na qual se retirou espécimes de anêmonas e mexilhões, situados na zona mesolitoral, do substrato onde estavam fixados. Em cada ponto de amostragem foram extraídos cinco espécimes da anêmona *Bunodosoma caissarum* e cinco espécimes do mexilhão *Perna perna* de mesma classe de tamanho. As anêmonas possuíam aproximadamente 3,0 cm de diâmetro e os mexilhões aproximadamente 7,0 cm de comprimento de concha. Após a retirada, os espécimes amostrados foram estocados separadamente em sacos plásticos vedados sob resfriamento em isopor, para o transporte até o laboratório. No laboratório as amostras foram congeladas para posterior liofilização e análise.

Em cada ponto de amostragem coletou-se água local a meio metro da superfície em garrafas de polietileno previamente descontaminadas. Estas amostras foram filtradas no mesmo dia da amostragem, no laboratório, em bancada limpa utilizando-se filtros de éster de celulose de 0,45 µm (Millipore) para a determinação da fração biodisponível de metais no material particulado em suspensão (MPS). Para cada estação de amostragem foram filtradas duplicatas para o cálculo da concentração de MPS (mg L⁻¹) na água e para a determinação de metais no MPS. Os filtros e todo o material de amostragem e filtração foram previamente

descontaminados. Para isso, os filtros permaneceram por 24h em banho de solução de ácido nítrico 10%, foram lavados com água Milli-Q e secos em estufa a 40°C. Após este processo, os filtros foram pesados e estocados em porta filtros descontaminados. As garrafas foram levadas a um banho de extran (Detertec) a 10% durante dois dias, depois foram enxaguadas e ficaram 8h em banho de ácido nítrico 10%. Após este procedimento, estas foram rinsadas com água Milli-Q duas vezes e levadas à estufa para secar. Também foram coletadas amostras de água em garrafas de vidro âmbar, as quais foram filtradas para posterior determinação de carbono orgânico na fração dissolvida e particulada.

Os pontos de amostragem e suas respectivas coordenadas encontram-se abaixo (Tabela 1). Para auxiliar na discussão dos resultados as estações de amostragem foram separadas em setores; o setor externo da Baía de Guanabara corresponde às estações Ilha Rasa, Ilha Redonda e Ilha Comprida; o setor de entrada corresponde às estações Cotunduba e Forte da Lage; e o setor interno corresponde às estações Ponte Rio-Niterói e Ilha do Governador (esta estação somente para a amostragem de 2009).

Tabela 1 - Estações de amostragem 2009 (n = 7) e 2013 (n = 6) e suas respectivas coordenadas

Pontos de amostragem	Latitude	Longitude
Ilha Rasa	23° 03' 40.5" S	43° 08' 57.6" W
Ilha Redonda	23° 04' 02.5" S	43° 11' 29.2" W
Ilha Comprida	23° 02' 12.4" S	43° 12' 15.3" W
Cotunduba	22° 57' 57.7" S	43° 09' 06.2" W
Forte da Lage	22° 56' 03.1" S	43° 08' 50.7" W
Ponte Rio-Niterói	22° 52' 14.1" S	43° 08' 58.6" W
Ilha do Governador	22° 49' 20.9" S	43° 12' 23.2" W

Para ilustrar as condições da área de estudo no momento das amostragens foram analisados alguns parâmetros físico-químicos (temp. (temperatura), salin. (Salinidade), O.D. (concentração de oxigênio dissolvido), pH e clorofila. Estes foram medidos através de uma sonda multiparamétrica nas estações de amostragem em 2009 e 2013 e encontram-se no anexo 2. Este anexo também apresenta a carga de material particulado em suspensão (mg L^{-1}) nas estações de amostragem nas quais foram amostrados os organismos em 2009 e 2013. Além disso, também foram

analisadas as concentrações de metais no MPS nos anos de 2009 e 2013 em situação de maré vazante (Anexo 3).

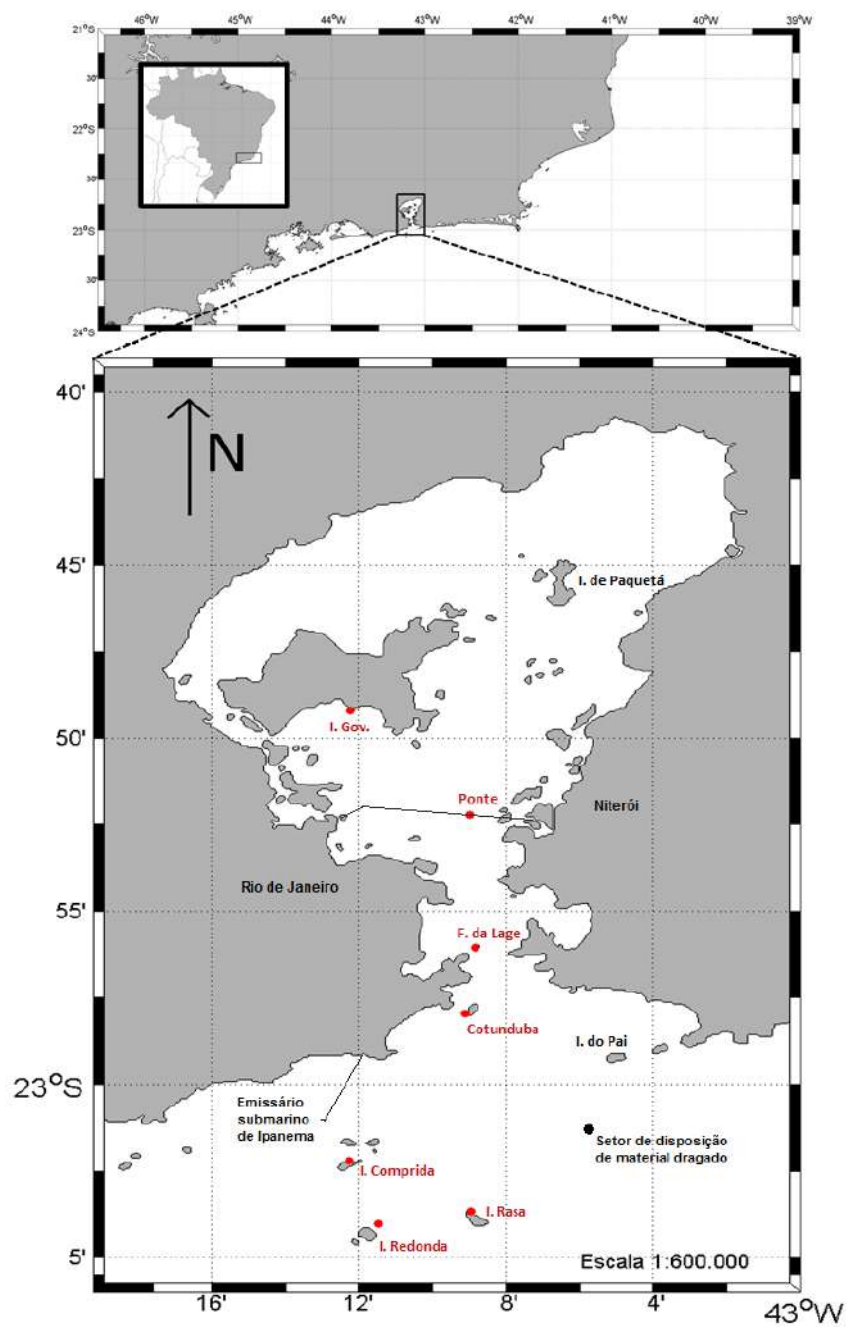


Figura 3 - Pontos de amostragem em vermelho. Ilha Rasa, Ilha Redonda, Ilha Comprida, Cotunduba, Forte da Lage, Pilar da Ponte Rio - Niterói e Ilha do Governador.

4.3.2 Análises de amostras no laboratório

4.3.2.1 Determinação de metais em anêmonas e mexilhões

No laboratório, os espécimes foram congelados em sacos vedados de plástico e posteriormente liofilizados à temperatura abaixo de -40°C durante 48 horas. Após esta etapa as amostras foram maceradas. Foram analisados cinco espécimes de *Bunodosoma caissarum* e cinco espécimes de *Perna perna* de cada estação de amostragem. Foram analisadas duplicatas de cada organismo. Pesou-se 0,3g de cada amostra liofilizada e macerada em tubos de teflon de microondas previamente descontaminados. A estas amostras foram adicionados 4 mL de HNO_3 (65%) e 2 mL de H_2O_2 (30%) e posteriormente as amostras foram levadas ao forno de microondas CEM-Mars em uma programação que atinge a temperatura de 180°C . Os extratos foram avolumados a 15 mL com água Milli-Q. Por fim determinou-se a concentração dos elementos alumínio (Al), arsênio (As), bário (Ba), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), cromo (Cr), estanho (Sn), ferro (Fe), manganês (Mn), níquel (Ni), titânio (Ti), vanádio (V) e zinco (Zn) nos extratos das amostras. Para a determinação dos elementos nos extratos foi utilizado um espectrômetro de massa com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), marca Thermo Fisher Scientific (Bremen, Alemanha), modelo iCAP Qc. Este ICP-MS é equipado com célula de colisão e de reação, cones de amostragem (“*sample cone*”) e espuma (“*skimmer*”) de níquel, câmara de nebulização ciclônica de duplo passo (“*baffled*”) de quartzo, nebulizador concêntrico de Teflon® (FPA-ST), Peltier, injetor de quartzo de 2,5 mm de diâmetro interno, amostrador automático modelo ASX 520 (CETAC Technologies, Omaha, Nebraska, USA) e software operacional Qtegra (versão 2.4.1800.96) para a aquisição dos dados. As condições de operação do equipamento foram: 1550 W de potência incidente, 14 L min^{-1} de vazão de gás no plasma, $0,80\text{ L min}^{-1}$ de vazão de gás auxiliar, $1,0\text{ L min}^{-1}$ de vazão de gás do nebulizador, *dwell time* de 10 ms e 1 canal por unidade de massa. Os elementos foram determinados na forma dos isótopos ^{27}Al , ^{47}Ti , ^{51}V , ^{53}Cr , ^{55}Mn , ^{57}Fe , ^{60}Ni , ^{65}Cu , ^{66}Zn , ^{75}As , ^{111}Cd , ^{118}Sn , ^{138}Ba e ^{208}Pb . Foram determinados em modo “padrão” (“*Standard*”) os isótopos ^{51}V , ^{53}Cr , ^{66}Zn , ^{111}Cd , ^{118}Sn , ^{138}Ba e ^{208}Pb e em modo “discriminação de energia” (KED – “*Kinetic Energy Discrimination*”) os isótopos ^{27}Al , ^{47}Ti , ^{55}Mn , ^{57}Fe , ^{60}Ni , ^{65}Cu e ^{75}As . Foi utilizado hélio (pureza 5.0) com vazão de 5 mL min^{-1} como gás de colisão. Para a correção de interferências de

transporte na introdução de amostras e de ionização, foi realizada uma padronização interna com a adição e monitoramento dos isótopos ^{45}Sc , ^{73}Ge , ^{103}Rh e ^{205}Tl , todos na concentração final de $5 \mu\text{g L}^{-1}$. As determinações dos analitos foram realizadas através de curvas analíticas com sete soluções-padrão para a calibração. A quantificação foi realizada por interpolação. As soluções foram geradas a partir da diluição de uma solução-padrão estoque monoelementar *SpecSol* de concentração 1.000 mg L^{-1} (Quimlab Química & Metrologia[®], Jardim Califórnia, Jacareí, São Paulo, Brasil) até a obtenção das concentrações desejadas utilizando água ultrapura obtida a partir de um sistema Milli-Q[®], modelo Direct 8 (Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, EUA). As determinações foram validadas com o uso de CRMs (Certified Reference Material) de tecido de ostras (NIST / 1566b). Em todas as bateladas de análises foram analisados também brancos.

4.3.2.2 Determinação de metais no material particulado em suspensão

As amostras de água coletadas em cada ponto de amostragem foram filtradas em filtros de éster de celulose com porosidade de $0,45 \mu\text{m}$ utilizando-se um kit de filtração. Os filtros contendo material particulado foram levados à estufa à 40°C até secarem e adquirirem peso constante. Após esta etapa, estes foram pesados e obteve-se a massa do material particulado em suspensão. Foram analisados dois filtros para cada estação de amostragem, deste modo, foram 12 amostras. Os filtros secos foram pesados em tubos de microondas descontaminados. A estas amostras foram adicionados 4 mL de HNO_3 (65%) e estas foram levadas ao forno microondas CEM-Mars em uma programação que atinge a temperatura de 175°C . Os extratos foram avolumados a 15 mL com água Milli-Q. Os metais determinados nestas amostras foram Al, As (ametal), Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Sn, Ti, V e Zn. As aberturas foram realizadas em forno de microondas CEM-Mars, em sistema fechado com 4 mL de ácido nítrico concentrado para cada filtro (adaptação do método EPA 3051A (<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3051a.pdf>)). Para a determinação das concentrações de metais no MPS, foi utilizado um espectrômetro de massa com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e as análises foram realizadas da mesma forma citada anteriormente para as amostras de organismos. As determinações foram validadas com o uso de CRM (Certified Reference Material) de

sedimento marinho (Marine Sediment NRC PACS-2) e em todas as bateladas de análises foram analisados também brancos.

4.3.2.3 Limites de detecção e recuperação dos padrões

Os limites de detecção dos metais determinados, tanto nos organismos, quanto no material particulado em suspensão, encontram-se na Tabela 2 abaixo. Nesta mesma tabela encontram-se as recuperações do CRM de tecido de ostra (NIST 1566b) utilizado para validar as determinações de metais na biota e do CRM de sedimento marinho (NRC PACS-2) o qual foi utilizado para validar as determinações de metais no MPS. As recuperações foram calculadas através da razão entre a concentração de cada metal determinado a partir da análise do CRM e o valor certificado; o valor obtido através do cálculo desta razão foi multiplicado por 100. Desta forma, foram obtidas as recuperações dos CRMs em porcentagem. Não há valores certificados de referência para Ba, Cr e Ti para os materiais certificados utilizados.

Tabela 2 - Limites de detecção da determinação de metais nas amostras em mg/kg e recuperações dos CRMs em porcentagem (%)

Metais	Al	As	Ba	Cd	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Ti	V	Zn
Limite de detecção (mg/kg)	0,05	0,04	0,01	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,03	0,01	0,01
Recuperação (%) CRM Biota	102	102	-	103	-	98	90	92	105	85	-	83	90
Recuperação (%) CRM MPS	-	-	-	95,6	88	91	-	93	89	85	-	89	98

4.3.2.4 Determinação de carbono orgânico total na água

As amostras de água foram armazenadas em frascos de vidro âmbar, acidificadas (pH= 2,0) com H₃PO₄ e imediatamente resfriadas para posterior determinação de carbono orgânico total (COT). As amostras foram analisadas em um analisador de carbono orgânico total (TOC-VCPH, Shimadzu). Este equipamento possui alta sensibilidade, com faixa analítica de medida entre 0 a 30000 mg L⁻¹. Seu limite de detecção é de 0,004 mg L⁻¹.

4.3.2.5 Tratamento estatístico dos resultados

Foi realizado tratamento estatístico dos dados obtidos através das determinações dos metais nas amostras. Desta forma, foram calculadas as médias, desvio padrão, valores mínimos e máximos, desvios padrão e coeficientes de variação, parâmetros que auxiliam na análise e compreensão dos resultados. Foram confeccionados gráficos contendo as concentrações médias e desvios padrão de cada metal em cada amostragem e também gráficos *box plot* comparando-se a média, o desvio padrão e os valores máximos e mínimos das concentrações obtidas para os setores interno, entrada e externo. Além disso, utilizou-se estatística não-paramétrica ANOVA Kruskal-Wallis e também realizou-se uma análise multivariada, para isso os dados foram normalizados. Assim, realizou-se a Análise de Componentes Principais (PCA), a Análise de Agrupamento (Agrupamento em árvore ou “Cluster”, utilizando o Método Ward) e foram confeccionadas matrizes de correlação (Spearman). Estas análises foram realizadas para se ter uma visão geral dos dados, comparando, agrupando e discutindo os dados relacionados a cada espécie separadamente. Além disso, realizou-se o Teste U de Mann-Whitney para avaliar se havia diferenças significativas entre as concentrações de cada metal em *B. caissarum* e *P. perna*. O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$. Para o tratamento estatístico, considerou-se que as concentrações das amostras que apresentaram concentrações abaixo do limite de detecção seriam metade do limite de detecção do metal.

Para o tratamento dos dados e análises estatísticas utilizou-se o programa EXCEL, SigmaPlot 11.0 e o pacote estatístico STATISTICA versão 8.0.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Metais

A seguir, nas Figuras 4 a 31, encontram-se gráficos mostrando a distribuição espacial das médias e do desvio padrão das concentrações dos metais nas amostragens de 2009 e 2013 em *Bunodosoma caissarum* e *Perna perna*.

Além disso, também foram analisadas as concentrações de metais no MPS nos anos de 2009 e 2013 (Anexo 3) em condições de maré vazante, as quais

demonstram a presença de metais na fração particulada os quais, dependendo da circulação oceânica, possivelmente são oriundos de águas oceânicas, de efluentes urbanos lançados pelos emissários submarinos, das águas da Baía de Guanabara, da presença de intenso tráfego de embarcações ou da disposição de material dragado.

Os parâmetros físico-químicos (temperatura, salinidade, oxigênio dissolvido e pH) e os dados de COT e clorofila encontram-se no anexo 2 e ilustram as condições das estações de amostragem no momento da coleta para os anos de 2009 e 2013. Dados deste anexo, como os de temperatura e de salinidade, refletem os gradientes de aumento das temperaturas e diminuição da salinidade da região insular adjacente em direção a região interna da Baía de Guanabara, observados usualmente nesta área (KALAS et al., 2009). Tanto estes dados quanto os de metais no MPS são um retrato do momento da amostragem. Já as concentrações de metais nos tecidos dos organismos refletem a incorporação destes metais ao longo do tempo.

As médias e os desvios padrão das concentrações dos metais analisados nos tecidos de *B. caissarum* e *P. perna* nas amostragens de 2009 e 2013 encontram-se nas tabelas 3 e 4 abaixo. No presente estudo analisou-se diversos elementos nos tecidos das espécies com o intuito de observar a variabilidade destes em uma área de estudo com diversas possíveis fontes (fontes pontuais, fontes difusas, contaminação crônica, intermitente e também aguda podem ocorrer na região) de metais utilizando espécies que podem apresentar diferentes respostas às flutuações das concentrações por possuírem fisiologias bastante diferentes. Assim, estas espécies apresentam potencial para serem utilizadas como biomonitores complementares na área de estudo.

Tabela 3 - Médias e desvio padrão das concentrações (mg kg⁻¹ (peso seco)) de metais em *B. caissarum* (n=5) em cada estação de amostragem em 2009 e 2013

<i>B. caissarum</i> 2009		Al	As	Ba	Cd	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Sn	Ti	V	Zn
I.Rasa	Média	26.26	17.66	5.24	0.12	0.97	2.66	110.8	6.66	0.32	0.22	N.D.	0.39	2.03	106.2
	DesvPad	6.84	1.70	1.11	0.05	0.36	0.42	1.05	1.60	0.02	0.09	N.D.	0.12	0.36	3.84
I.Red.	Média	27.32	8.34	6.25	0.09	1.02	2.92	107.1	4.26	0.39	0.03	N.D.	0.65	1.98	89.8
	DesvPad	3.24	1.10	0.80	0.01	0.64	0.56	6.94	0.44	0.07	0.01	N.D.	0.27	0.28	11.2
I.Compr.	Média	23.59	12.45	7.55	0.09	0.98	1.38	132.9	4.67	0.39	0.35	N.D.	0.70	1.41	100.5
	DesvPad	3.96	2.54	0.91	0.03	0.77	0.35	10.65	0.80	0.09	0.08	N.D.	0.15	0.20	8.38
Cotund.	Média	50.61	15.33	10.45	0.05	1.93	9.70	153.5	7.74	1.42	0.33	N.D.	1.68	3.14	106.1
	DesvPad	17.09	3.29	2.38	0.03	1.06	7.01	12.71	0.79	1.15	0.02	N.D.	0.39	0.90	13.8
F.Lage	Média	95.95	17.88	3.51	0.02	1.51	8.02	193.9	10.47	0.80	0.06	N.D.	3.79	1.58	117.7
	DesvPad	18.67	2.25	0.72	0.01	0.88	3.45	28.50	1.03	0.64	0.03	N.D.	0.05	0.39	8.06
Ponte	Média	67.48	11.64	2.77	0.02	1.06	3.28	159.1	12.94	1.04	0.18	N.D.	1.94	1.92	132.5
	DesvPad	23.99	1.17	0.45	0.00	0.76	0.55	3.68	1.03	0.28	0.02	N.D.	0.71	0.23	3.68
I.Gov.	Média	188.66	11.17	4.04	0.02	3.14	3.19	313.2	15.82	1.48	0.24	N.D.	7.33	1.80	154.8
	DesvPad	63.50	2.69	0.66	0.00	1.49	0.63	60.00	0.93	1.07	0.01	N.D.	1.46	0.06	1.34

<i>B. caissarum</i> 2013		Al	As	Ba	Cd	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Sn	Ti	V	Zn
I.Rasa	Média	13.72	32.11	0.77	0.11	2.53	6.08	96.41	5.57	2.35	0.06	0.03	0.74	0.67	81.54
	DesvPad	20.76	10.02	0.86	0.04	1.10	0.94	2.32	0.54	1.30	0.08	0.00	0.53	0.00	12.60
I.Red.	Média	22.81	31.75	0.76	0.15	4.00	6.16	108.5	4.97	1.62	0.01	0.03	0.68	0.82	86.08
	DesvPad	23.27	3.68	0.36	0.07	2.41	0.44	1.44	0.62	1.72	0.00	0.00	0.18	0.07	8.20
I.Compr.	Média	21.32	36.60	0.59	0.16	7.68	6.29	134.9	6.43	5.20	0.01	0.09	0.94	1.22	100.9
	DesvPad	14.14	11.72	0.25	0.08	5.98	1.50	10.45	0.48	5.71	0.00	0.05	0.83	0.23	24.85
Cotund.	Média	35.34	37.67	0.96	0.10	10.14	7.23	163.9	9.14	6.31	0.29	0.10	1.90	0.36	107.3
	DesvPad	25.85	1.63	0.66	0.18	16.07	1.84	19.20	1.25	8.72	0.26	0.09	1.40	0.00	20.87
F.Lage	Média	85.40	36.92	1.26	0.02	8.60	11.76	159.5	19.84	4.69	0.11	0.13	2.55	2.79	107.9
	DesvPad	24.76	9.38	0.34	0.00	12.93	3.57	12.33	4.95	3.66	0.08	0.09	1.32	0.24	19.52
Ponte	Média	43.93	33.70	0.67	0.02	2.99	9.87	128.2	18.00	1.67	0.05	0.05	1.26	3.83	120.2
	DesvPad	33.86	8.40	0.22	0.00	0.86	3.96	6.65	2.72	0.90	0.06	0.03	0.47	0.28	32.74

Tabela 4 - Médias e desvio padrão das concentrações (mg kg⁻¹ (peso seco)) de metais em *P. perna* (n=5) em cada estação de amostragem em 2009 e 2013

<i>P. perna</i> 2009		Al	As	Ba	Cd	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Sn	Ti	V	Zn
I.Rasa	Média	67.12	13.40	1.05	0.77	2.65	5.79	125.44	12.80	5.16	0.65	N.D.	1.34	12.67	124.31
	DesvPad	27.17	2.73	0.11	0.17	0.90	0.69	24.03	0.59	0.40	0.04	N.D.	0.15	1.47	1.81
I.Red.	Média	35.72	12.73	0.65	1.14	2.42	3.08	135.39	10.47	10.43	0.56	N.D.	0.90	11.00	153.07
	DesvPad	8.14	5.78	0.10	0.32	0.04	1.24	19.91	3.91	1.27	0.01	N.D.	0.27	0.98	9.34
I.Compr.	Média	73.70	12.66	1.14	0.61	1.94	4.42	140.54	12.44	3.40	0.58	N.D.	2.55	9.95	104.07
	DesvPad	18.81	9.03	0.31	0.19	0.26	1.01	38.69	1.93	1.38	0.07	N.D.	0.70	1.05	3.13
Cotund.	Média	178.47	10.29	1.21	0.36	2.49	10.12	147.85	26.52	7.37	1.50	N.D.	5.06	3.51	164.99
	DesvPad	16.03	1.29	0.16	0.10	0.17	3.08	18.63	5.11	2.11	0.20	N.D.	0.30	0.18	29.66
F.Lage	Média	62.35	8.10	1.15	0.15	4.04	8.91	155.16	29.81	9.74	1.03	N.D.	1.72	2.54	260.87
	DesvPad	20.95	1.66	0.08	0.02	3.11	0.52	69.54	5.01	1.73	0.05	N.D.	0.41	0.13	36.12
Ponte	Média	93.75	0.00	0.23	0.06	2.40	8.27	103.67	40.33	2.80	0.12	N.D.	2.73	0.47	104.33
	DesvPad	10.90	0.00	0.02	0.01	1.04	0.06	7.23	9.07	0.60	0.02	N.D.	0.15	0.05	12.42

<i>P. perna</i> 2013		Al	As	Ba	Cd	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Sn	Ti	V	Zn
I.Rasa	Média	42.62	21.53	1.83	0.76	58.14	7.71	287.82	25.83	12.17	0.71	0.16	1.56	18.57	122.89
	DesvPad	3.25	10.82	0.77	0.32	85.66	4.62	288.43	22.35	7.15	0.47	0.13	0.33	5.73	47.94
I.Red.	Média	141.66	14.77	2.05	0.42	16.91	8.48	134.40	23.61	9.64	0.65	0.28	3.92	10.73	98.64
	DesvPad	32.38	1.60	0.10	0.07	14.06	1.97	33.90	12.45	4.34	0.28	0.11	1.45	2.51	14.35
I.Compr.	Média	79.20	13.12	1.46	0.25	24.25	7.65	375.01	15.49	8.85	0.56	1.41	3.85	12.76	106.24
	DesvPad	54.13	2.59	0.37	0.06	4.41	3.90	395.42	8.65	6.01	0.22	1.41	2.72	8.12	48.77
Cotund.	Média	242.06	14.28	2.16	0.09	150.09	9.52	761.68	30.25	14.01	1.48	0.43	7.85	12.67	91.95
	DesvPad	85.57	1.44	0.58	0.03	195.31	3.07	654.72	7.05	10.00	0.42	0.01	2.44	3.00	12.66
F.Lage	Média	125.82	10.69	1.61	0.05	23.41	13.10	184.08	187.21	8.86	0.25	0.40	4.51	2.28	114.71
	DesvPad	39.63	0.67	0.24	0.01	40.59	4.16	143.20	136.42	3.55	0.06	0.47	1.67	0.58	15.33
Ponte	Média	87.01	10.34	1.67	0.02	4.50	15.63	62.82	75.83	5.00	0.21	0.11	3.41	0.19	85.82
	DesvPad	37.83	2.55	0.57	0.00	2.12	3.32	13.62	31.90	5.18	0.32	0.00	1.33	0.01	21.07

Neste capítulo, os metais analisados nos tecidos de *B. caissarum* e *P. perna* foram organizados de acordo com o seu padrão de distribuição geral ao longo da área de estudo. Para auxiliar na discussão dos resultados, as estações de amostragem foram separadas em setores. O setor externo da Baía de Guanabara corresponde às estações Ilha Rasa, Ilha Redonda e Ilha Comprida; o setor de entrada corresponde às estações Ilha de Cotunduba e Forte da Lage; e o setor interno corresponde às estações Ponte Rio-Niterói e Ilha do Governador (esta última estação somente ocorreu para a amostragem de 2009).

4.4.1.1 Cádmi

A Figura 4 apresenta as médias e os desvios padrão das concentrações de cádmio em *Bunodosoma caissarum* e *Perna perna* oriundas das amostragens realizadas em 2009 e 2013 ao longo das estações de amostragem.

As concentrações de cádmio nos tecidos dos organismos foram maiores no setor externo da Baía de Guanabara tanto na amostragem de 2009 quanto na de 2013. As concentrações de Cd em *B. caissarum* e *P. perna* demonstram um gradiente de aumento do setor interno para o setor externo (Figuras 4 e 5). Francioni et al. (2004) e Batista et al. (2014) também encontraram concentrações mais altas de Cd no setor externo do que na parte interna da baía em mexilhões *Perna perna* e em esponjas *Hymeniacidon heliophila* e *Paraleucilla magna*, respectivamente.

As concentrações de Cd nos tecidos de *B. caissarum* e *P. perna* apresentam o mesmo padrão do gradiente de salinidade observado na área de estudo (Anexo 2; KALAS et al., 2009), com salinidades e concentrações de Cd crescentes do setor interno da Baía de Guanabara para a região insular adjacente à baía (setor externo).

Provavelmente estas maiores concentrações de cádmio no setor externo ocorrem na fase dissolvida, pois em águas salinas este metal forma clorocomplexos que podem estar mais disponíveis quanto maior a salinidade e o pH (WAELES et al., 2009). Em ambientes mais redutores, como a região interna da baía, este metal precipita como sulfeto de cádmio (CHASIN; CARDOSO, 2003) e possivelmente apresenta baixa biodisponibilidade. De acordo com Comans e Van Dijk (1988), em estuários, o cádmio pode ser mobilizado do material particulado proveniente de rios quando ocorre a mistura com a água do mar. Esta mobilização é decorrente da formação de clorocomplexos de cádmio que se apresentam na forma dissolvida. Segundo Francioni et al. (2004), a biodisponibilidade de cádmio é muito mais influenciada pela salinidade do local e pelo conteúdo do material particulado do que pela presença de ligantes orgânicos. Desta forma, nas ilhas Rasa, Redonda e Comprida, que apresentam maior salinidade que os outros locais estudados, provavelmente o cádmio está mais disponível para assimilação pela biota. Apesar da biodisponibilidade de Cd ser comprovadamente maior em águas mais salinas, há a possibilidade de haver aporte de Cd para a região insular adjacente à baía através de

fontes como os emissários submarinos ou a disposição de material dragado em área relativamente próxima à região.

O limite máximo de cádmio presente em peixes e produtos da pesca permitido para o consumo humano é de 1,0 mg/kg (Anexo 4) de acordo com o MINISTÉRIO DA SAÚDE (1998). A maioria dos espécimes de *P. perna* amostrados na Ilha Redonda, em 2009, ultrapassou este limite e os espécimes amostrados em 2009 e 2013 estão relativamente próximos deste limite.

Carvalho et al. (1991); Carvalho e Lacerda (1992) encontraram na Baía de Guanabara concentrações de cádmio em *P. perna* e *B. caissarum* de aproximadamente 0,1 mg/kg. As concentrações de Cd no presente trabalho são similares para *B. caissarum*, porém as concentrações encontradas em *P. perna* foram maiores para a região insular.

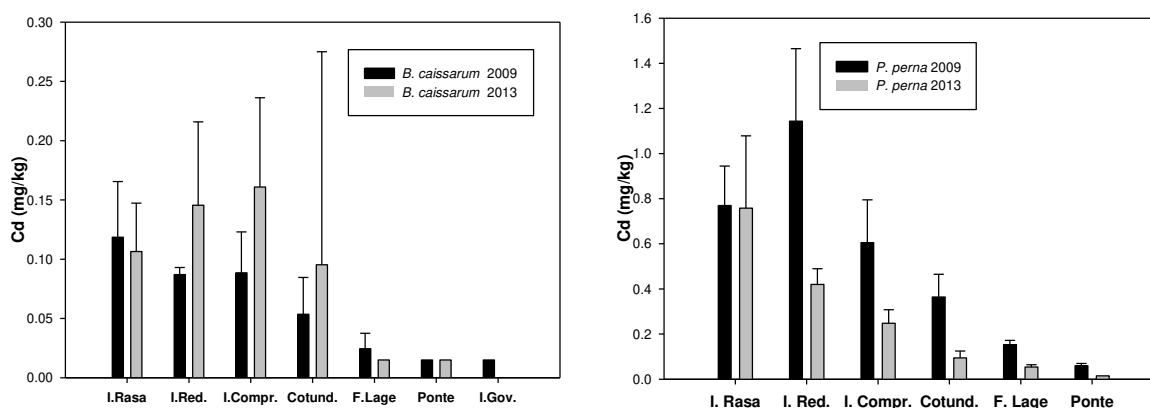


Figura 4 - Gráficos das médias e desvio padrão das concentrações de cádmio (mg/kg) em *Bunodosoma caissarum* e *Perna perna* ao longo das estações de amostragem.

A Figura 5 representa as médias, desvios padrão e valores mínimos e máximos das concentrações de cádmio nos tecidos de *B. caissarum* (A) e *P. perna* (M) por setores (externo, entrada e interno) e por campanha (amostragem 2009 (1C) e amostragem 2013 (2C)).

De acordo com o teste Kruskal-Wallis, na amostragem de 2009 as concentrações de Cd em *B. caissarum* não apresentaram diferenças significativas entre os setores interno e entrada ($p=0,9941$), porém há diferença significativa entre os setores entrada e externo ($p=0,0430$) e entre os setores interno e externo ($p=0,0090$). Na amostragem de 2013 as concentrações de Cd se mostraram

significativamente diferentes para o setor interno e externo (teste de Kruskal-Wallis, $p=0,0389$) e para os setores entrada e externo ($p=0,235$). No entanto, não houve diferenças significativas entre os setores entrada e interno (teste de Kruskal-Wallis, $p>0,05$).

Nas amostragens de 2009 e 2013 as concentrações de Cd em *P. Perna* se mostraram significativamente diferentes para os setores interno e externo (teste de Kruskal-Wallis, respectivamente $p=0,0066$ e $p=0,0001$) devido ao gradiente de maiores concentrações no setor externo para menores concentrações no interno. Na amostragem de 2013 as concentrações de Cd também foram significativamente diferentes para os setores entrada e externo (teste de Kruskal-Wallis, $p=0,0009$).

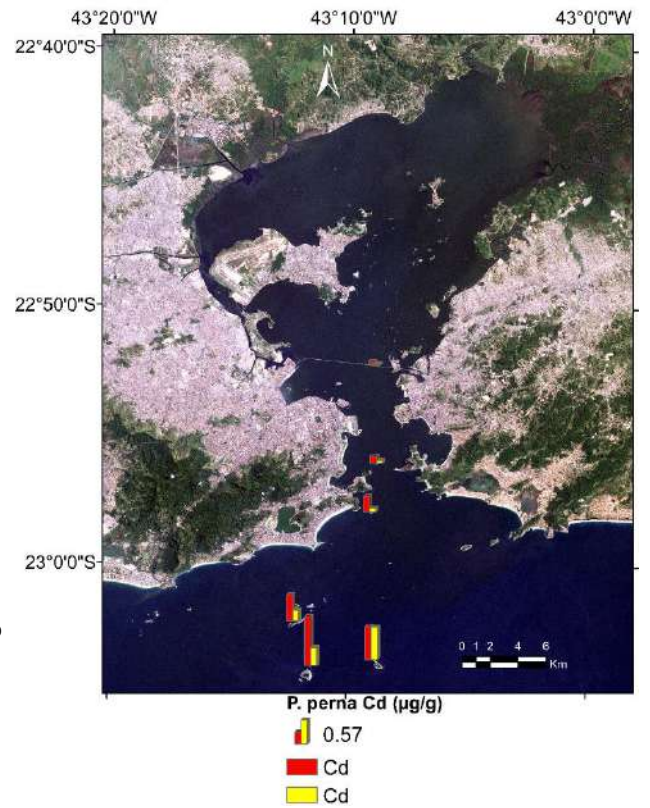
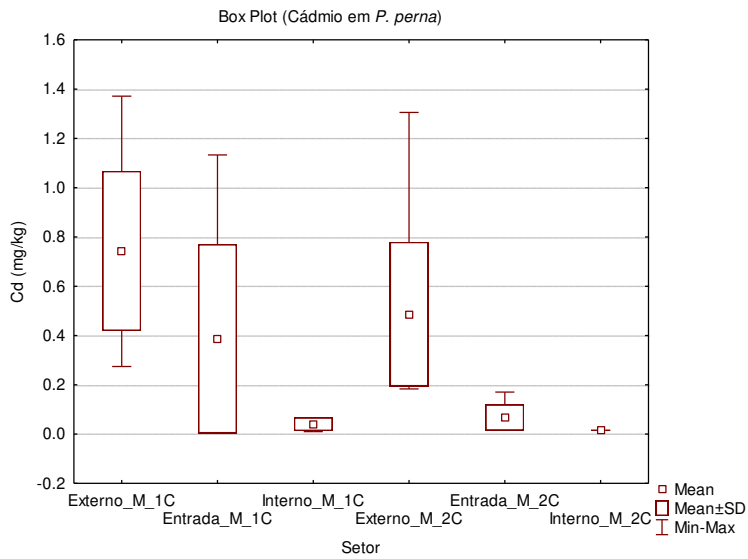
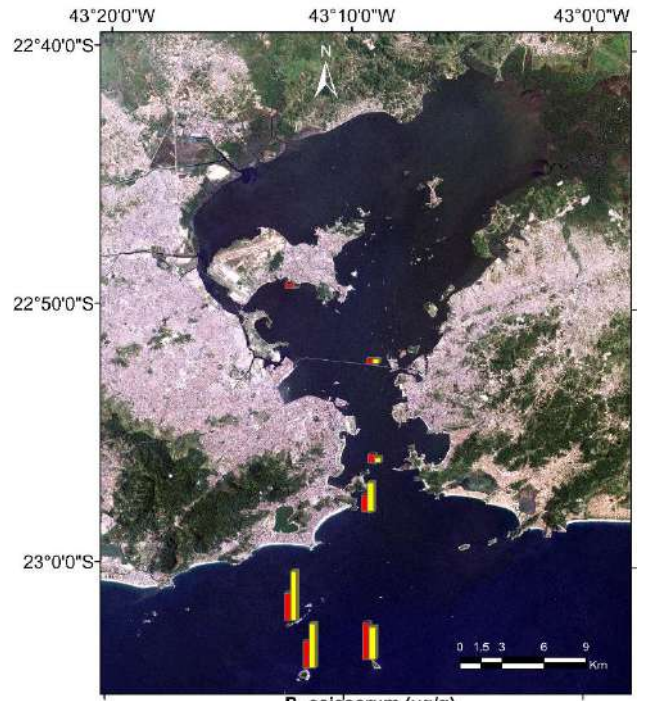
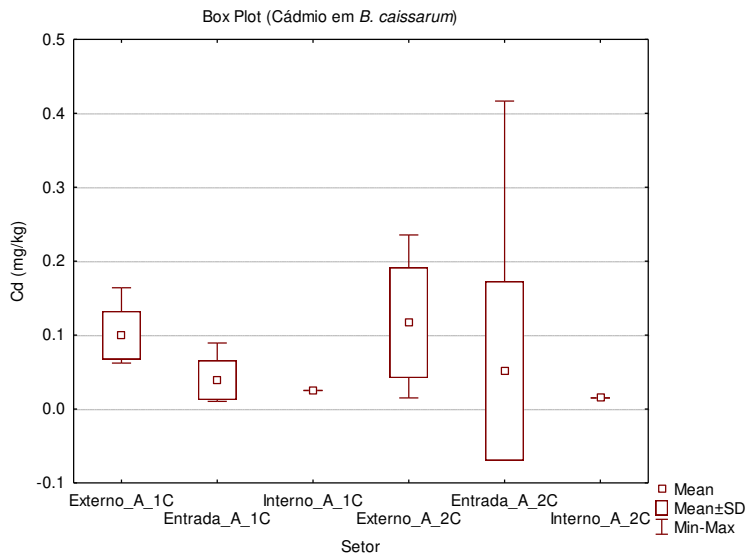


Figura 5 - Distribuição das concentrações de cádmio (mg/kg) em *B. caissarum* (A) e *P. perna* (M) ao longo dos setores externo, entrada e interno nas amostragens 1C (2009) e 2C (2013).

4.4.1.2 Arsênio

As concentrações de arsênio em *B. caissarum* e *P. perna* se mostraram mais altas na amostragem de 2013 (Figura 6 e 7), indicando que houve um aumento das concentrações deste metalóide na área de estudo. Para *P. perna*, assim como observado para a amostragem de 2009, continua havendo um gradiente de diminuição da concentração de arsênio do setor externo para o setor interno. Este gradiente sugere que há uma fonte de arsênio próxima ao setor externo ou este metalóide pode encontrar-se mais biodisponível na fração particulada, pelo fato de somente *P. perna* demonstrar este gradiente. Em geral as concentrações de As foram mais elevadas para *B. caissarum*.

O limite máximo de arsênio presente em peixes e produtos da pesca permitido para o consumo humano é de 1,0 mg/kg (Anexo 4) de acordo com o MINISTÉRIO DA SAÚDE (1998). Todos os espécimes de *P. perna* amostrados ultrapassaram este limite.

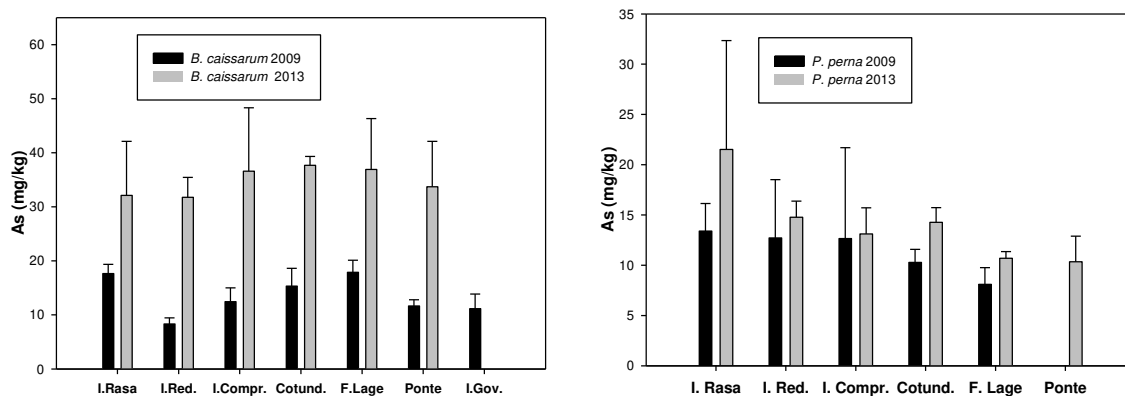


Figura 6 - Gráficos das médias e desvio padrão das concentrações de arsênio (mg/kg) em *Bunodosoma caissarum* e *Perna perna* ao longo das estações de amostragem.

De acordo com o teste Kruskal-Wallis, na amostragem de 2009 as concentrações de As em *B. caissarum* não apresentaram diferenças significativas entre os setores entrada e interno ($p=0,8679$) e entre os setores interno e externo ($p=1,0000$), porém há diferença significativa entre os setores entrada e externo ($p=0,0385$). Não houve diferenças significativas entre os setores (teste de Kruskal-Wallis, $p>0,05$) para a amostragem de 2013.

Utilizando-se o teste Kruskal-Wallis, na amostragem de 2013 somente há diferença significativa entre os setores interno e externo ($p=0,0091$) para as concentrações de As em *P. perna*. Na figura 7 é possível observar um gradiente de aumento das concentrações de arsênio do setor interno para o externo, por isso a diferença significativa entre os setores interno e externo. Este gradiente foi observado para *P. perna* para ambos os anos de amostragem. O aumento das concentrações de As sugere um incremento no aporte deste metalóide para a área de estudo.

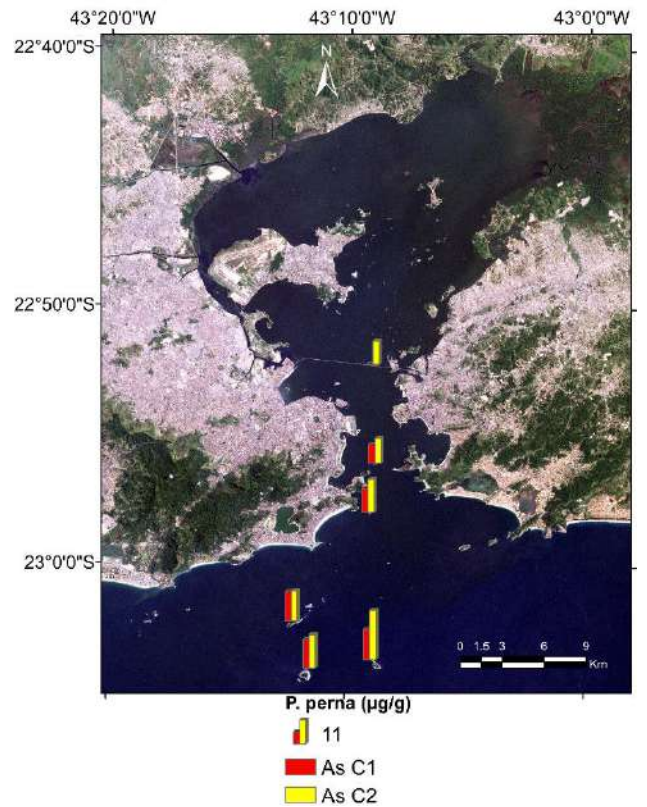
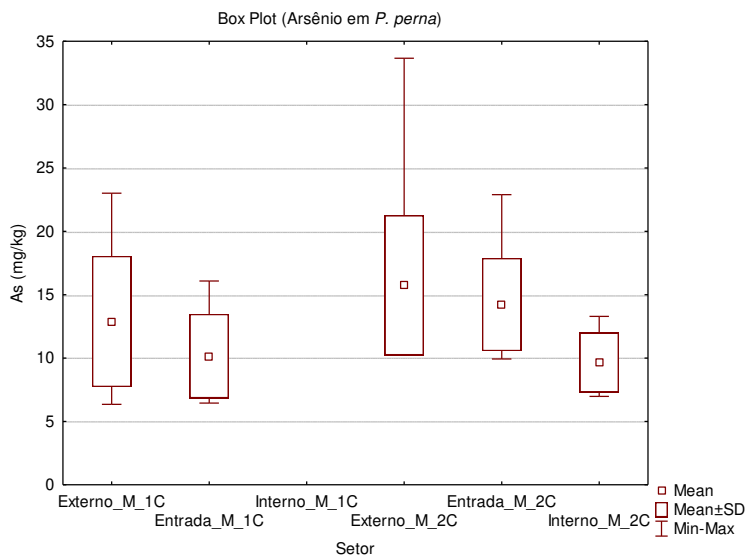
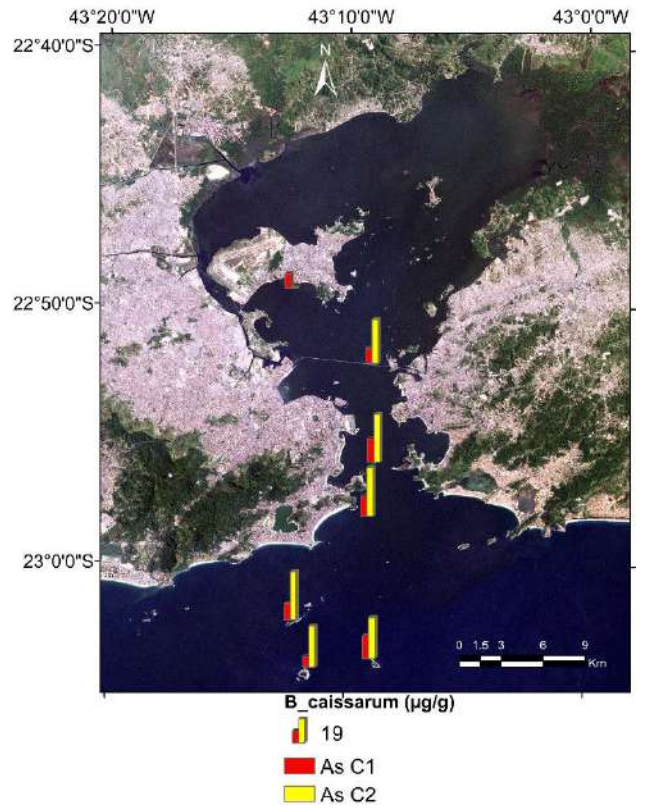
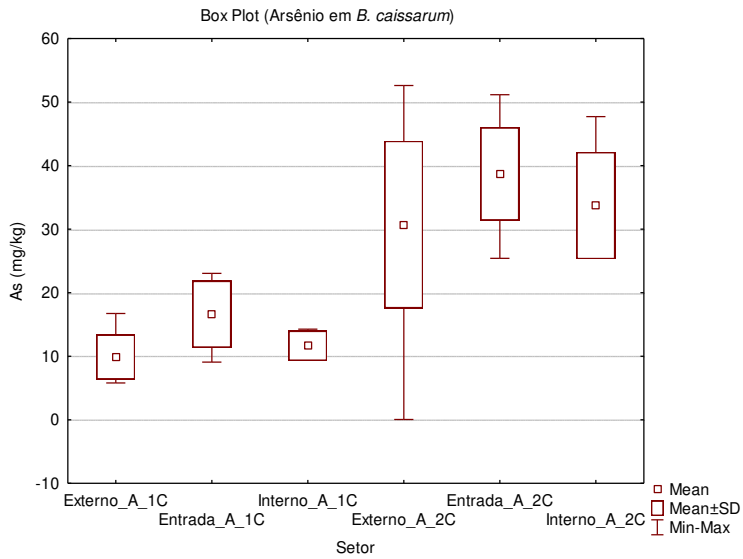


Figura 7 - Distribuição das concentrações de arsênio (mg/kg) em *B. caissarum* (A) e *P. perna* (M) ao longo dos setores externo, entrada e interno nas amostragens 1C (2009) e 2C (2013).

4.4.1.3 Vanádio

As concentrações de V em *P. perna* indicam um gradiente de aumento das concentrações de V do setor interno para o setor externo para as duas campanhas amostrais (Figuras 8 e 9). Desta forma, fica evidente que o V está mais biodisponível para *P. perna* no setor externo. No entanto, *B. caissarum* não demonstrou a presença de um gradiente de concentração na amostragem de 2009. Já na amostragem de 2013 observa-se a presença de um gradiente inverso ao observado para *P. perna*. Possivelmente o V foi bioacumulado por meio de diferentes frações (dissolvido ou particulado) pelas diferentes espécies. A maior assimilação de vanádio por *Perna perna* proveniente do setor externo pode ocorrer devido ao vanádio ser o segundo metal de transição mais abundante na água do mar (SELLA et al., 2006), ser um micronutriente para diversos organismos marinhos (MELO, 2003), além de ser acumulado em alguns organismos marinhos, como em ascídias, a níveis de até 10 milhões de vezes maiores que os encontrados na água do mar (MICHIBATA et al., 2003). Uma hipótese é que este metal seja essencial para *Perna perna*. Ou então pode haver alguma fonte antrópica, como a remobilização pelas constantes dragagens ou os emissários submarinos.

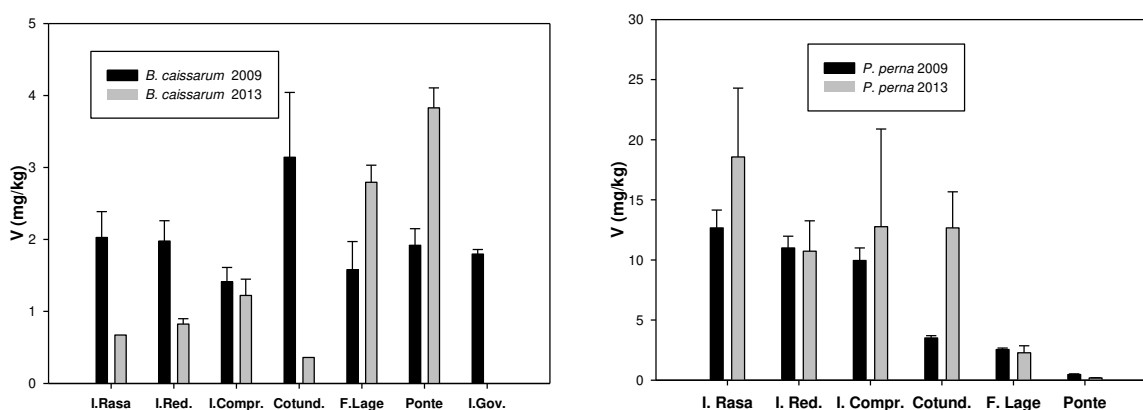


Figura 8 - Gráficos das médias e desvio padrão das concentrações de vanádio (mg/kg) em *Bunodosoma caissarum* e *Perna perna* ao longo das estações de amostragem.

De acordo com o teste Kruskal-Wallis, na amostragem de 2009 as concentrações de V em *B. caissarum* não apresentaram diferenças significativas entre os setores ($p > 0,05$). Porém, na amostragem de 2013 não houve diferenças significativas somente entre os setores entrada e externo.

Na amostragem de 2009 as concentrações de V em *P. perna* somente foram significativamente diferentes entre os setores interno e externo (teste de Kruskal-Wallis, $p=0,0035$). O mesmo se deu para a campanha de 2013 ($p=0,0003$). Isto ocorreu devido ao gradiente observado de aumento das concentrações de V do setor interno para o setor externo nas duas campanhas amostrais. A Figura 9 demonstra este gradiente observado para *P. perna* nas duas campanhas amostrais.

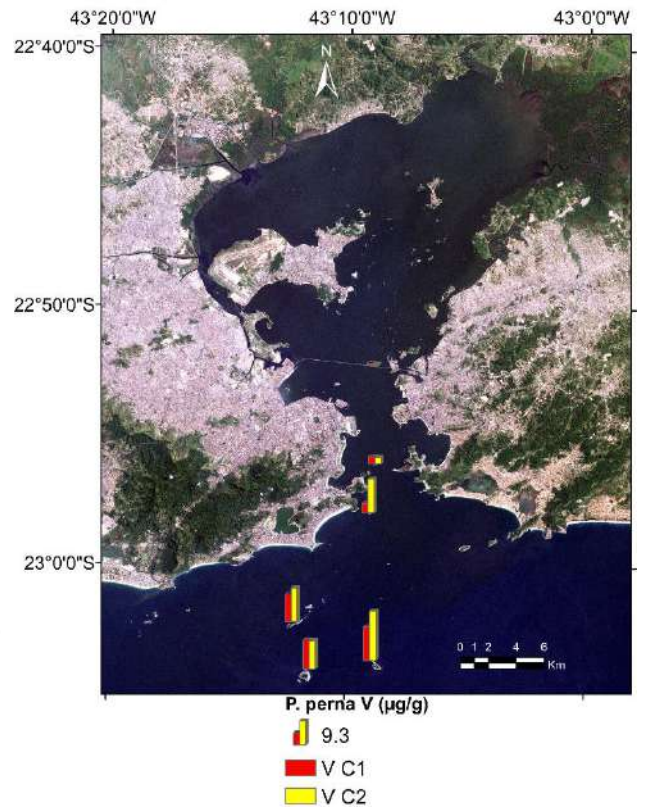
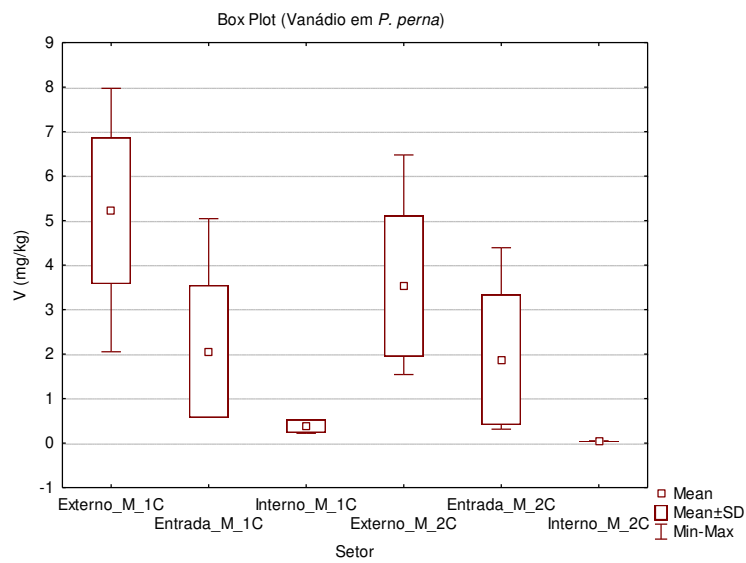
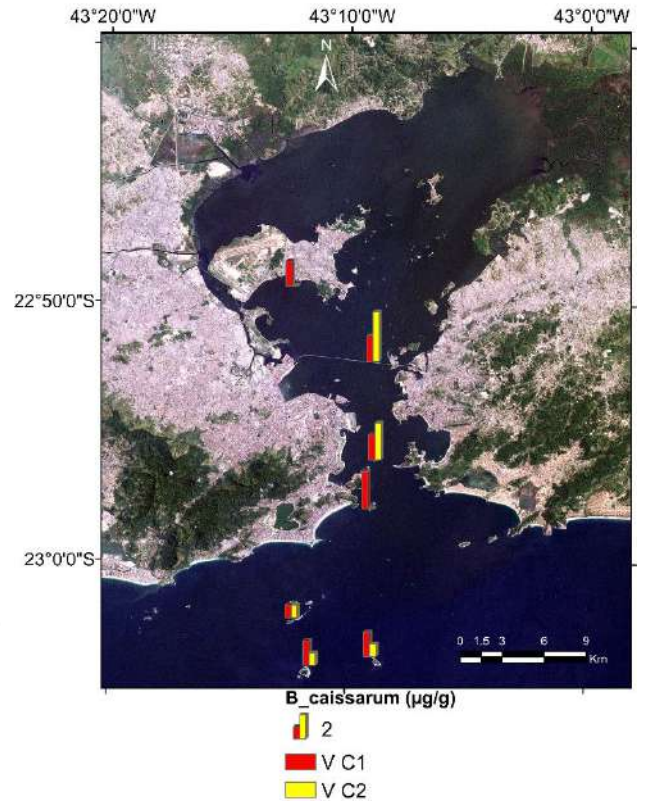
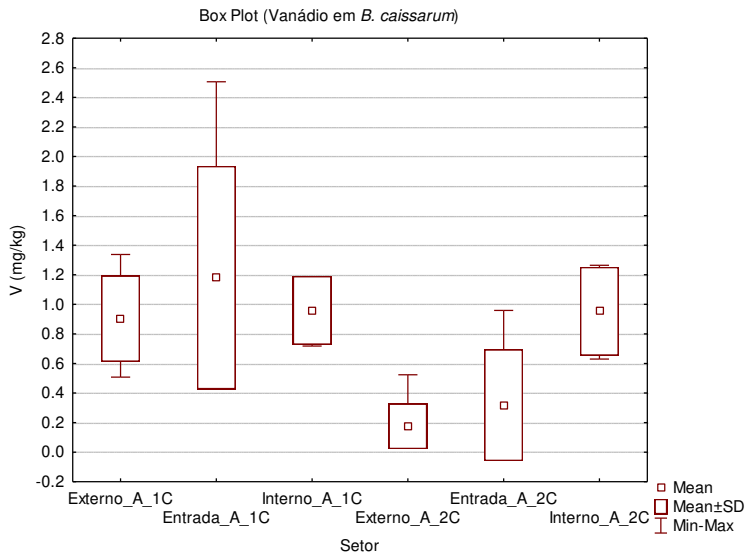


Figura 9 - Distribuição das concentrações de vanádio (mg/kg) em *B. caissarum* (A) e *P. perna* (M) ao longo dos setores externo, entrada e interno nas amostragens 1C (2009) e 2C (2013).

4.4.1.4 Bário

B. caissarum bioacumulou bário em concentrações maiores que as encontradas em *P. perna*, duas ou mais vezes maiores para amostragem de 2009 (Figuras 10 e 11). Entretanto, o mesmo não foi observado para os dados de 2013, nos quais as concentrações se mostraram próximas para ambas as espécies. Em 2009 houve altas concentrações de Ba para *B. caissarum* proveniente do setor externo, porém este padrão não foi observado em 2013. Possivelmente as fontes de Ba presentes em 2009 podem ter sido reduzidas gerando assim menor bioacumulação de Ba por *B. caissarum*. As concentrações de Ba nos espécimes de *B. caissarum* e *P. perna* se mostraram similares ao longo das estações em 2013. Para o MPS (Anexo 3) não se observou nenhum gradiente de concentração, somente maiores concentrações na estação mais interna, Ponte Rio-Niterói, na amostragem de 2013.

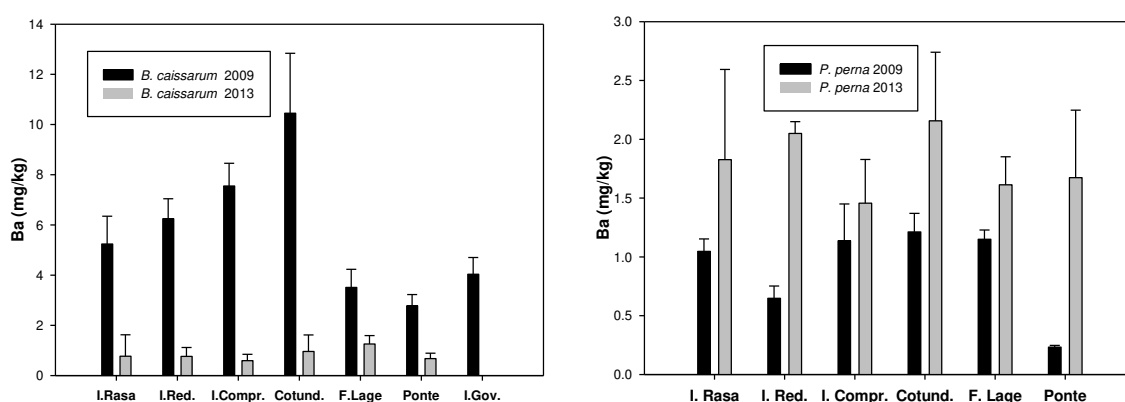


Figura 10 - Gráficos das médias e desvio padrão das concentrações de bário (mg/kg) em *Bunodosoma caissarum* e *Perna perna* ao longo das estações de amostragem.

As concentrações de Ba em *B. caissarum* não apresentaram diferenças significativas entre os setores para ambas as campanhas de amostragem (teste de Kruskal-Wallis, $p > 0,05$). Já as concentrações de Ba em *P. perna* somente apresentaram diferença significativa entre os setores entrada e interno (teste de Kruskal-Wallis, $p = 0,0455$) para a campanha amostral de 2009. No entanto, na amostragem de 2013 não houve diferença significativa entre os setores (teste de Kruskal-Wallis, $p > 0,05$).

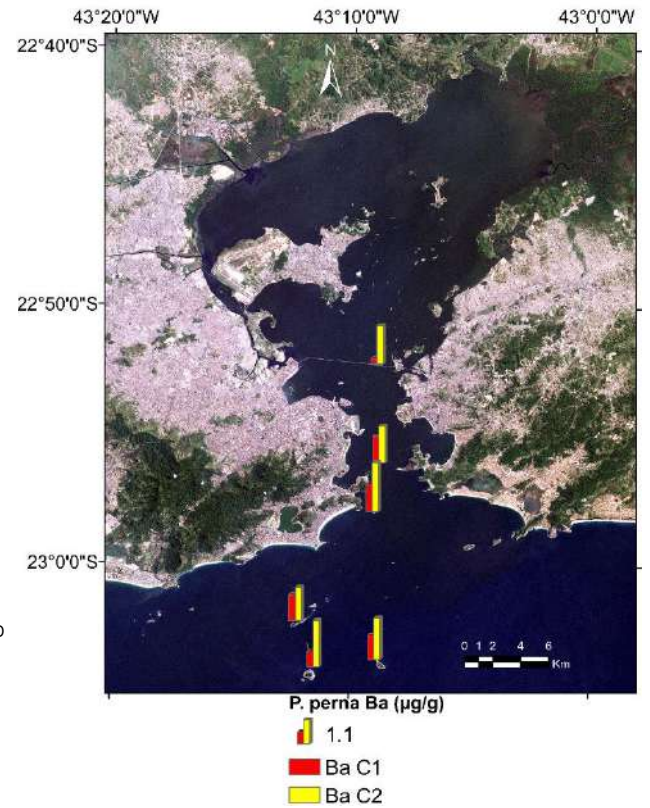
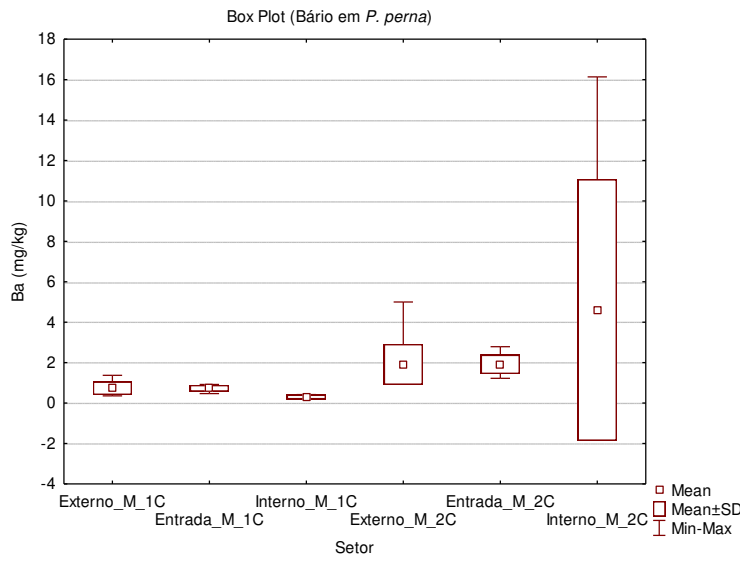
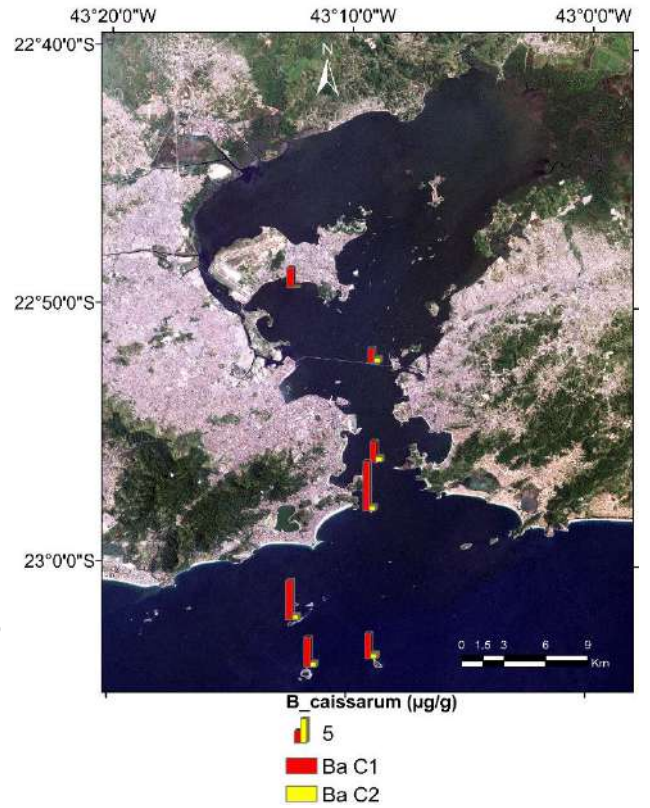
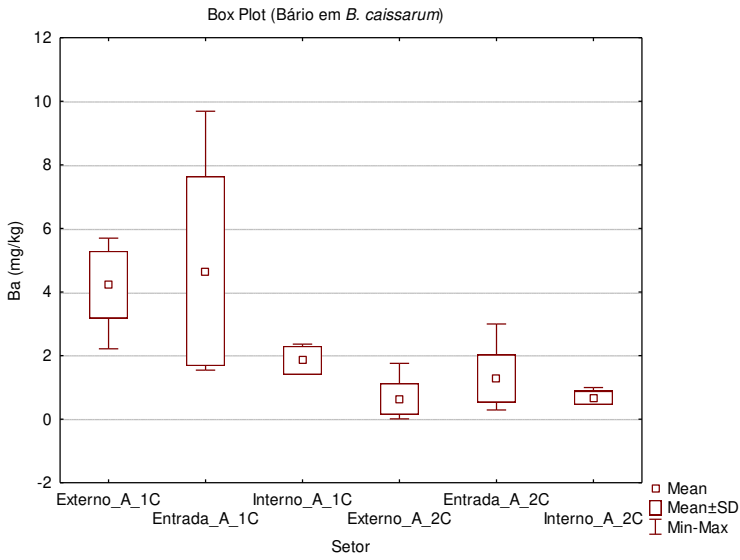


Figura 11 - Distribuição das concentrações de bário (mg/kg) em *B. caissarum* (A) e *P. perna* (M) ao longo dos setores externo, entrada e interno nas amostragens 1C (2009) e 2C (2013).

4.4.1.5 Zinco

A distribuição das concentrações de Zn nos tecidos de *B. caissarum* indica um gradiente de aumento das concentrações de Zn do setor externo para o setor interno (Figuras 12 e 13). O mesmo não pode ser bem observado para *P. perna*. No entanto, a figura 13 demonstra um gradiente inverso para as concentrações de Zn em *P. perna* na amostragem de 2013, com maiores concentrações deste metal na região insular adjacente. O Zn pode estar mais biodisponível ou há um aumento no aporte deste metal nesta região. As concentrações de Zn no MPS (Anexo 3) em 2013 se mostraram mais elevadas, principalmente na estação Ilha Rasa.

Assim como foi observado por Carvalho et al. (1991); Carvalho e Lacerda (1992) na Baía de Guanabara, as concentrações de zinco nos organismos foram as maiores, em ordem de grandeza, quando comparadas às dos outros metais. Estas altas concentrações de zinco, principalmente nos moluscos e crustáceos, provavelmente ocorrem devido à importância deste elemento no seu metabolismo. De acordo com Bowen (1979), cerca de 90 enzimas destes organismos contêm zinco e este é acumulado em grânulos polimetálicos. Além disso, este metal também é utilizado na produção de gametas e no transporte de oxigênio (REZENDE; LACERDA, 1986). Estes fatores permitem que os organismos suportem altas concentrações de zinco em sua composição sem que sejam afetados.

O limite máximo de zinco presente em alimentos (Anexo 4) permitido para o consumo humano é de 50 mg/kg (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1965), todas as concentrações em *Perna perna* neste trabalho ultrapassaram este limite.

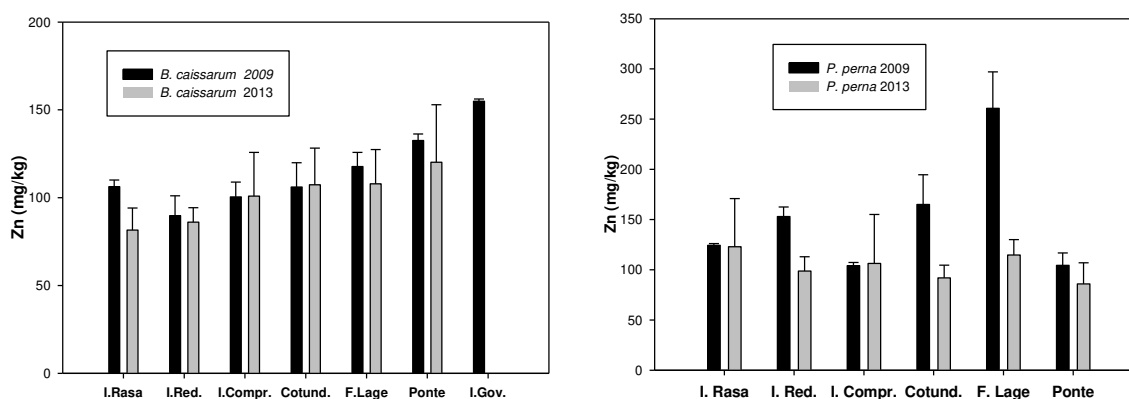


Figura 12 - Gráficos das médias e desvio padrão das concentrações de zinco (mg/kg) em *Bunodosoma caissarum* e *Perna perna* ao longo das estações de amostragem.

De acordo com o teste Kruskal-Wallis, na amostragem de 2009 as concentrações de Zn em *B. caissarum* apresentaram diferenças significativas somente para os setores interno e externo ($p=0,0110$). Isto provavelmente ocorreu devido ao gradiente de aumento das concentrações do setor externo para o setor interno. Não houve diferenças significativas entre os setores ($p>0,05$) para a amostragem de 2013.

Utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis, na amostragem de 2009 as concentrações de Zn em *P. perna* apresentaram diferença significativa somente entre os setores interno e entrada ($p=0,0093$). Já para a amostragem de 2013, não houve diferenças significativas entre os setores ($p>0,05$). O gradiente observado para *B. caissarum* não ocorre para *P. perna*.

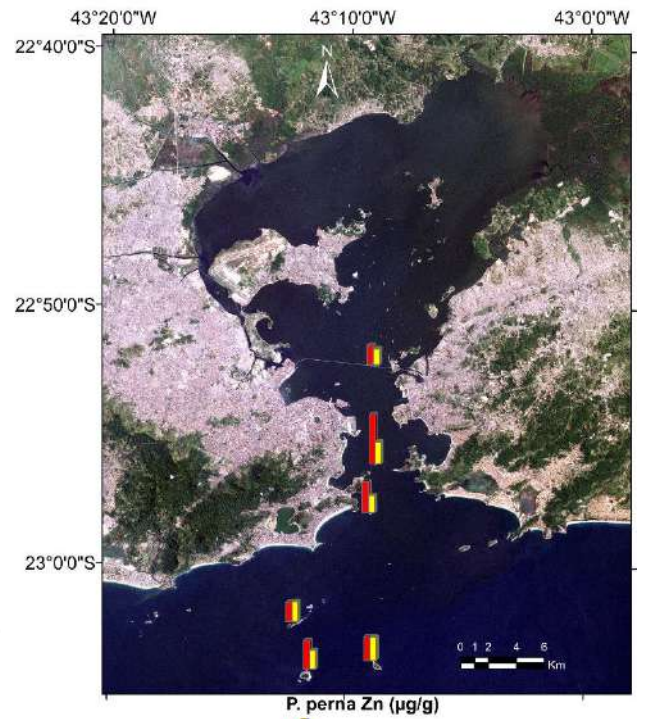
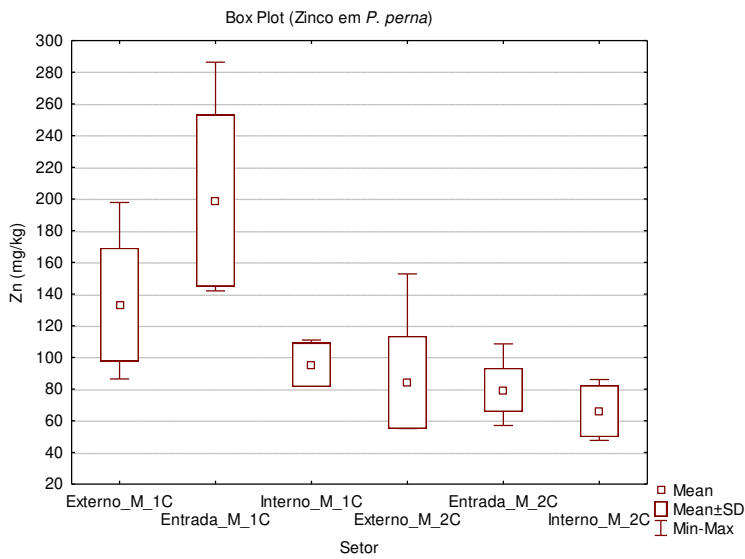
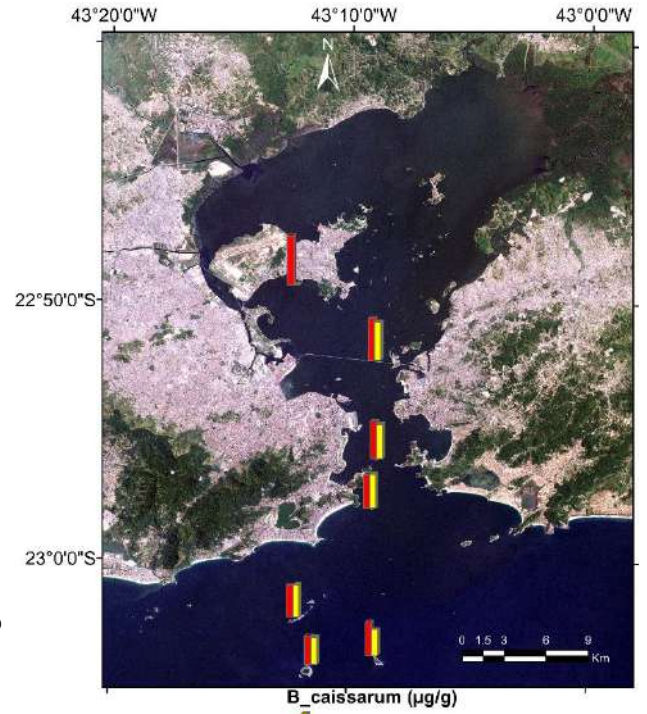
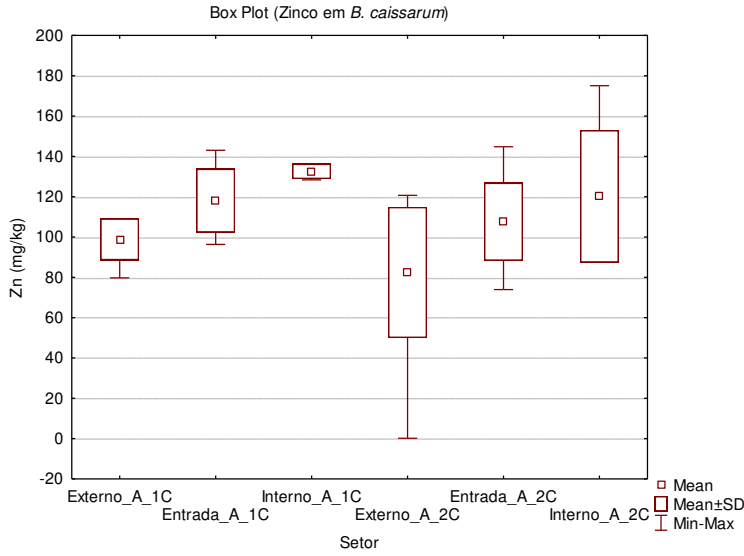


Figura 13 - Distribuição das concentrações de zinco (mg/kg) em *B. caissarum* (A) e *P. perna* (M) ao longo dos setores externo, entrada e interno nas amostragens 1C (2009) e 2C (2013).

4.4.1.6 Ferro

Para Carvalho et al. (2001), as altas concentrações de ferro em *Perna perna* estão provavelmente relacionadas às altas concentrações deste metal encontradas no material particulado suspensão. A partir da observação dos resultados do presente estudo (Figuras 14 e 15 e Anexo 3), pode-se notar, em geral, que as concentrações de ferro em principalmente *B. caissarum* e MPS, mas também para *P. perna* apresentaram um gradiente de concentração com maiores concentrações de Fe no setor interno e entrada. Isto ocorre provavelmente porque estas áreas se encontram mais próximas às principais fontes deste metal. Além disso, o ferro é um elemento redox-sensível e sofre uma dinâmica complexa em ambientes parcialmente redutores ou redutores. Nos ambientes onde os sedimentos são parcialmente redutores, como o setor interno da Baía de Guanabara os íons Fe^{2+} são liberados. Parte destes íons se espalha com a turbulência na coluna d'água e estes são oxidados a Fe^{3+} . Estes cátions têm baixa solubilidade e precipitam na superfície do material particulado em suspensão (FERNANDEZ, 1994). Desta forma, devido às altas concentrações deste metal na baía e ao ferro apresentar comportamento redox-sensível ocorrem altas concentrações deste metal no MPS e nos organismos no setor interno da baía. No presente trabalho, pode-se observar esse comportamento. Nas estações mais internas, as quais são mais redutoras, as concentrações deste metal são maiores tanto na biota quanto no MPS e à medida que as águas vão ficando mais oxigenadas as concentrações de ferro vão diminuindo em ambos os compartimentos. Batista et al. (2014) também observou este gradiente de maiores concentrações de ferro no setor interno para menores concentrações no setor externo em esponjas na Baía de Guanabara.

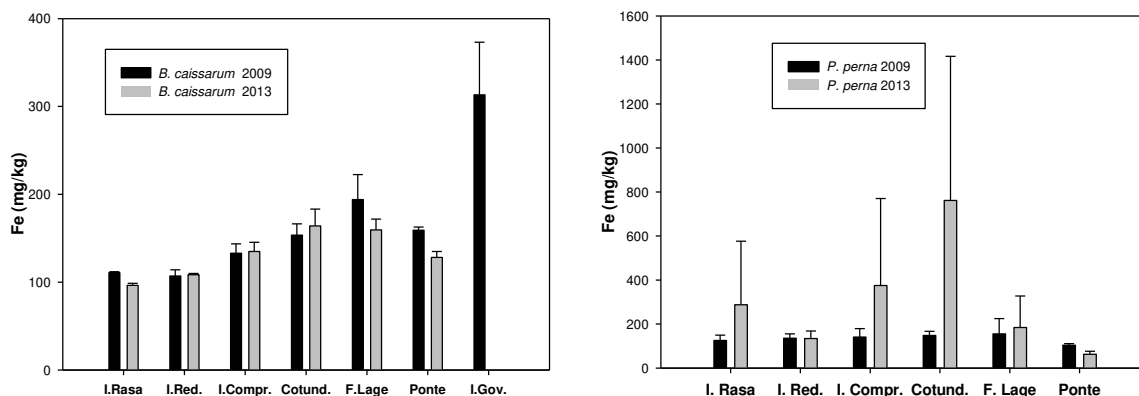


Figura 14 - Gráficos das médias e desvio padrão das concentrações de ferro (mg/kg) em *Bunodosoma caissarum* e *Perna perna* ao longo das estações de amostragem.

Nas amostragens de 2009 e 2013 somente houve diferença significativa entre os setores entrada e externo (teste de Kruskal-Wallis, $p=0,0050$ e $p=0,0347$, respectivamente) para as concentrações de Fe em *B. caissarum*.

Nas amostragens de 2009 não houve diferença significativa entre os setores (teste de Kruskal-Wallis, $p>0,05$) para as concentrações de Fe em *P. perna*. No entanto, na campanha amostral de 2013 somente houve diferença significativa entre os setores entrada e interno (teste de Kruskal-Wallis, $p=0,0092$) para as concentrações de Fe em *P. perna*.

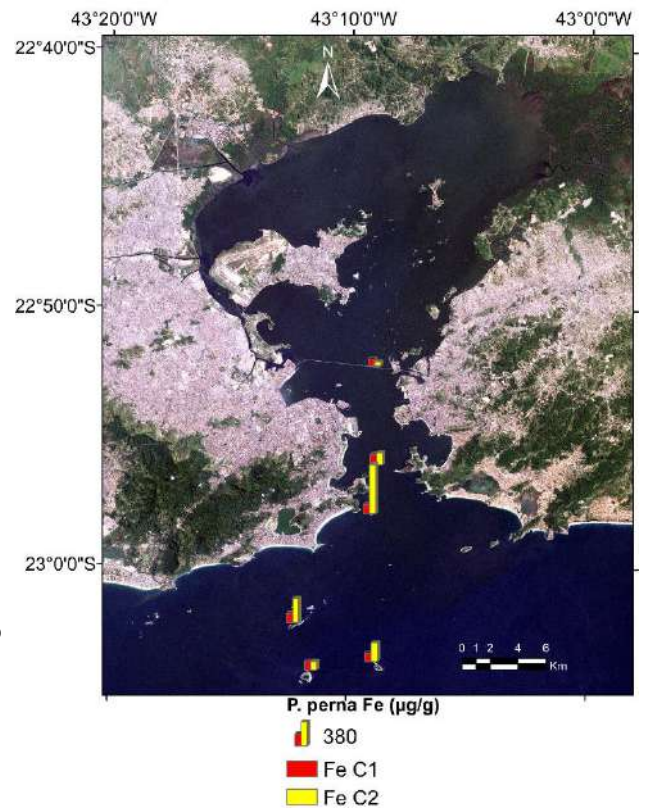
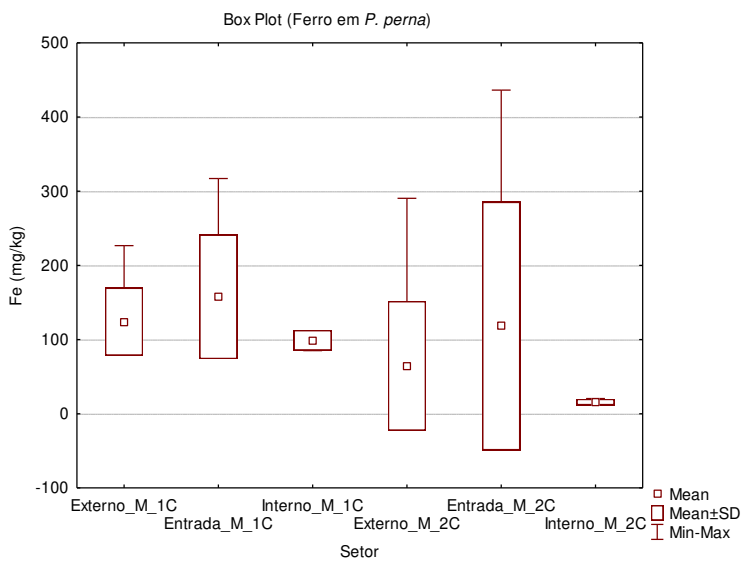
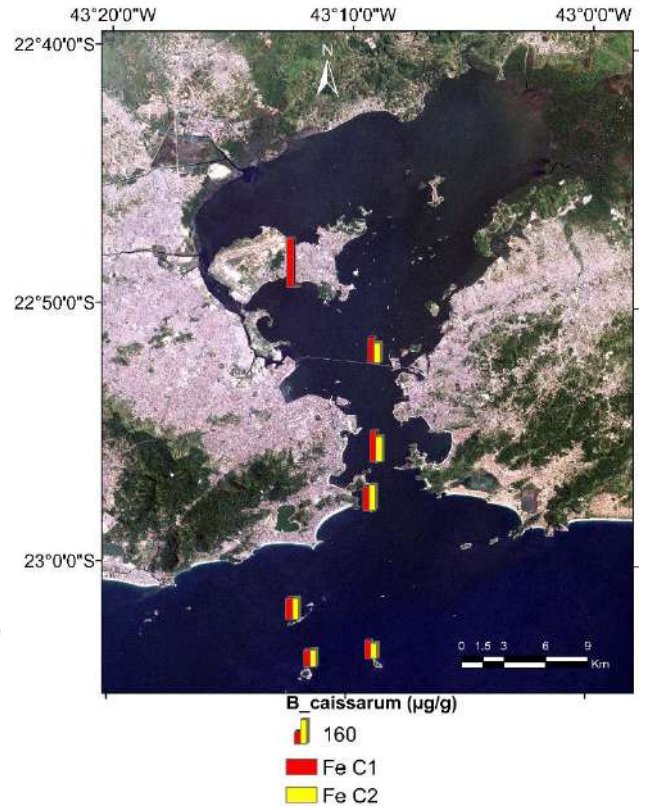
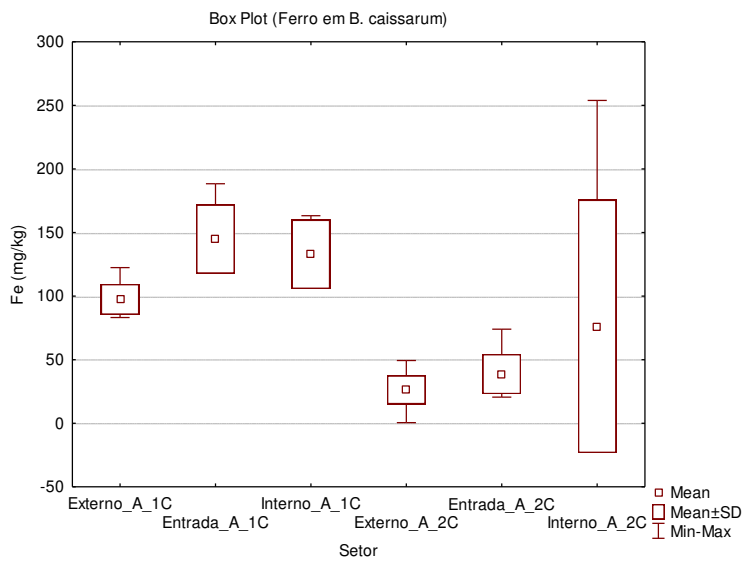


Figura 15 - Distribuição das concentrações de ferro (mg/kg) em *B. caissarum* (A) e *P. perna* (M) ao longo dos setores externo, entrada e interno nas amostragens 1C (2009) e 2C (2013).

4.4.1.7 Manganês

Tanto para *B. caissarum* quanto para *P. perna* e o MPS pode-se observar um gradiente de concentrações crescentes de Mn do setor externo para o interno (Figuras 16 e 17 e Anexo 3). O manganês, assim como o ferro, é muito redox-sensível e seu comportamento geoquímico se assemelha ao deste metal (FERNANDEZ, 1994). Desta forma, este metal é mais biodisponível em ambientes parcialmente redutores. No presente trabalho, pode-se observar este comportamento, já que no setor interno da Baía de Guanabara, o qual é mais redutor, as concentrações deste metal na biota foram maiores; em águas mais oxigenadas, como o setor externo da baía, as concentrações de manganês diminuíram. Batista (2010) também observou este gradiente para as concentrações de manganês em esponjas na Baía de Guanabara.

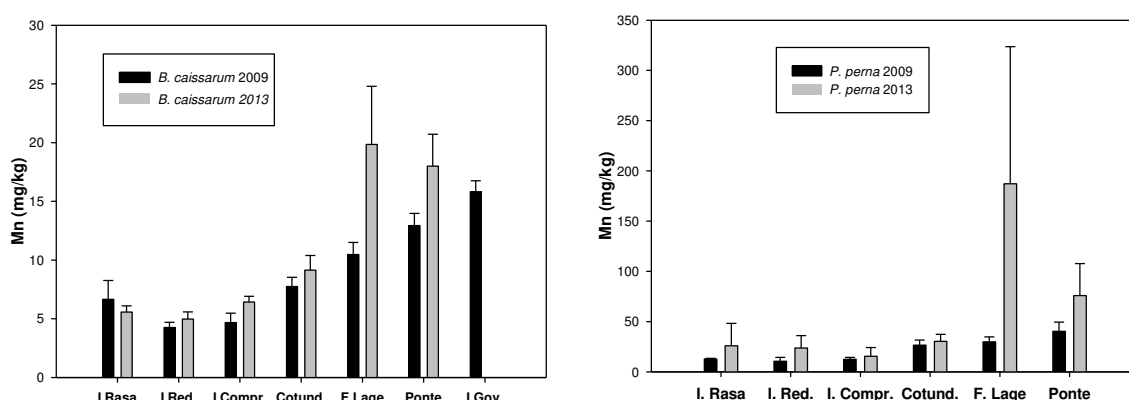


Figura 16 - Gráficos das médias e desvio padrão das concentrações de manganês (mg/kg) em *Bunodosoma caissarum* e *Perna perna* ao longo das estações de amostragem.

De acordo com o teste Kruskal-Wallis, na amostragem de 2009 as concentrações de Mn em *B. caissarum* e em *P. perna* somente apresentaram diferenças significativas entre os setores interno e externo ($p=0,0048$ e $p=0,0066$, respectivamente). Já para a amostragem de 2013 houve diferenças significativas entre os setores interno e externo ($p=0,0001$ e $p=0,0107$, respectivamente) e os setores entrada e externo ($p=0,0014$ e $p=0,0070$, respectivamente). Estas diferenças significativas entre os setores interno e externo em ambas as campanhas amostrais são decorrentes do gradiente observado de aumento das concentrações de Mn do setor externo para o interno.

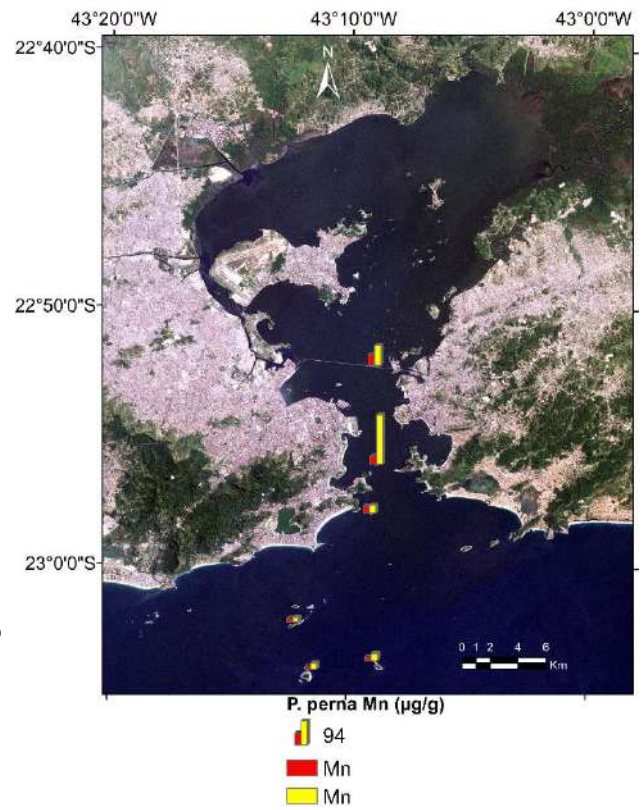
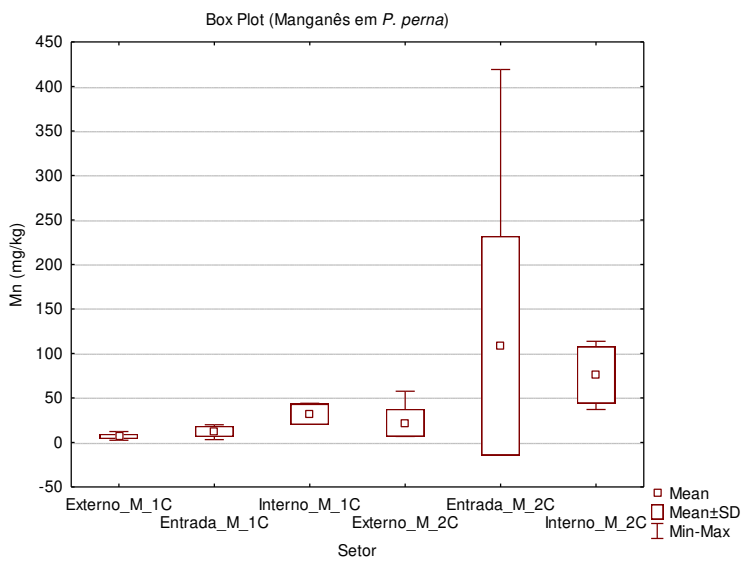
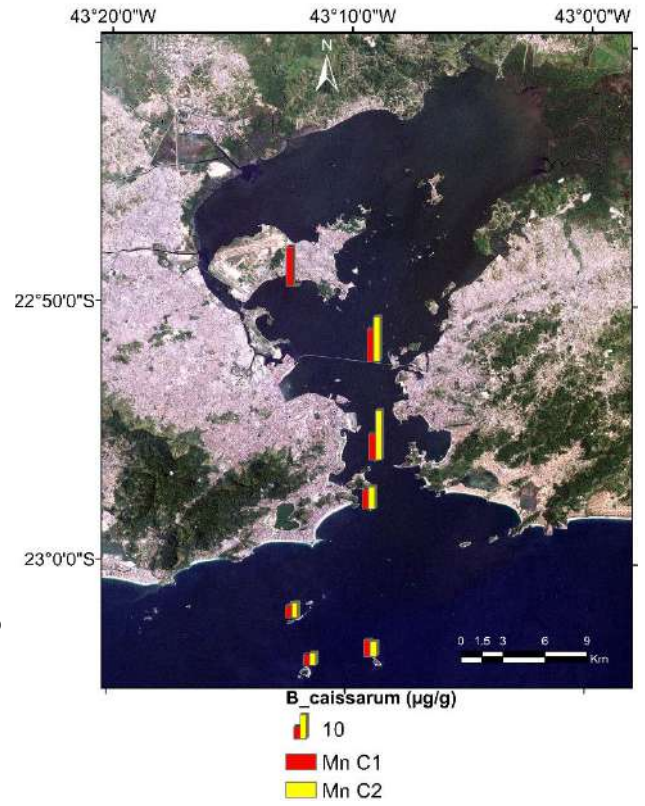
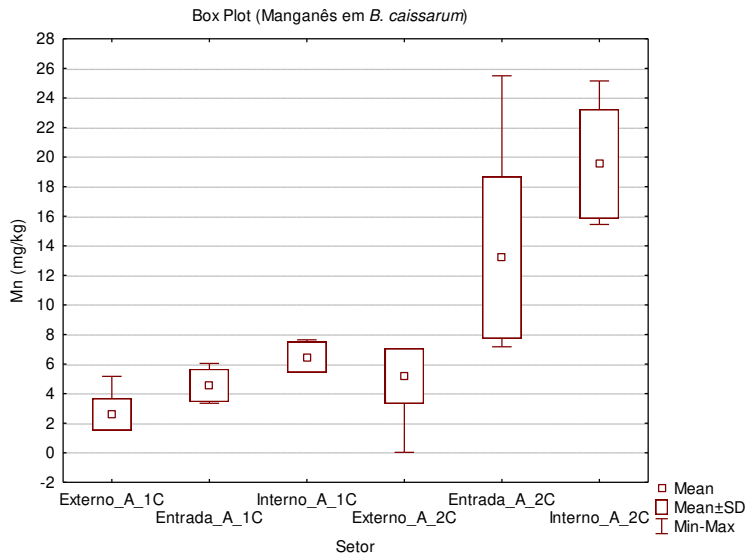


Figura 17 - Distribuição das concentrações de manganês (mg/kg) em *B. caissarum* (A) e *P. perna* (M) ao longo dos setores externo, entrada e interno nas amostragens 1C (2009) e 2C (2013).

4.4.1.8 Cobre

A partir das Figuras 18 e 19 pode-se observar, pelas concentrações de Cu nos tecidos de *B. caissarum* e *P. perna*, que na campanha amostral de 2013 há um gradiente crescente de concentrações do setor externo para o setor interno. Em 2009 este gradiente foi observado somente para as concentrações em *P. perna*.

Carvalho e Lacerda (1992) observaram que as concentrações de cobre em diversos organismos foram similares ao longo da costa do Rio de Janeiro e supõem que este fato provavelmente reflete a forte regulação metabólica deste metal essencial por organismos marinhos. Rezende e Lacerda (1986) observaram o mesmo comportamento no *Perna perna*. Estes autores encontraram concentrações de cobre no mexilhão entre 6,5 a 12 mg/kg na Baía de Guanabara. Carvalho et al., (1991); Carvalho e Lacerda (1992) encontraram concentrações de cobre de aproximadamente 10 mg/kg em *P. perna* e em *B. caissarum* nos locais de amostragem na baía. As concentrações acima citadas são próximas às encontradas no presente estudo para ambos os organismos. No entanto, a partir das Figuras 16 e 17 pode-se observar que as concentrações de Cu em geral aumentaram de 2009 para 2013 nos tecidos de ambas as espécies. Provavelmente a área de estudo está recebendo maiores cargas de efluentes urbanos, os quais possuem altas concentrações de Cu, do que em 2009. Outra fonte de Cu é possivelmente o maior tráfego de embarcações que liberam cobre a partir das tintas *antifoulings* usadas nos cascos de navios (FERNANDEZ et al., 2005).

O limite máximo de cobre presente em alimentos (Anexo 4) permitido para o consumo humano é de 30 mg/kg (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1965), nenhuma das concentrações em *Perna perna* neste trabalho ultrapassaram este limite.

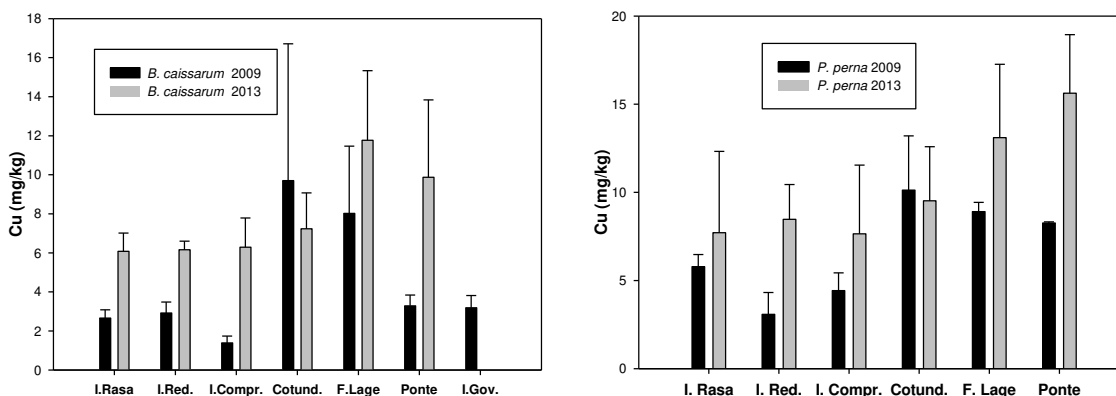


Figura 18 - Gráficos das médias e desvio padrão das concentrações de cobre (mg/kg) em *Bunodosoma caissarum*, *Perna perna* e no material particulado ao longo das estações de amostragem.

De acordo com o teste Kruskal-Wallis, na amostragem de 2009 as concentrações de Cu em *B. caissarum* foram significativamente diferentes somente para os setores entrada e externo ($p=0,0047$). Já para a amostragem de 2013 não houve diferenças significativas entre os setores (teste de Kruskal-Wallis, $p>0,05$).

Para a amostragem de 2009 e também para a de 2013, somente houve diferença significativa para as concentrações de Cu em *P. perna* entre os setores interno e externo (teste de Kruskal-Wallis, $p=0,0091$ e $p=0,0033$). Esta diferença ocorreu devido ao gradiente acentuado observado para Cu em *P. perna* com concentrações crescentes do setor externo para o setor interno (Figura 17).

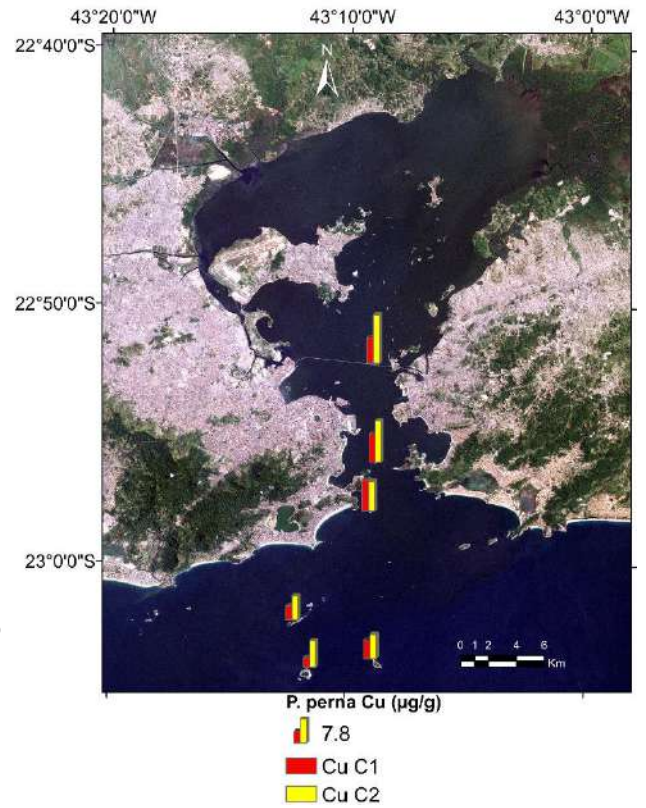
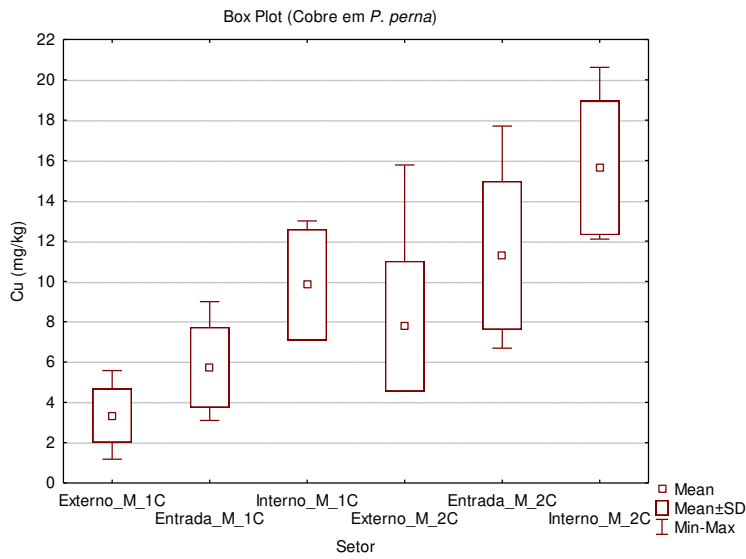
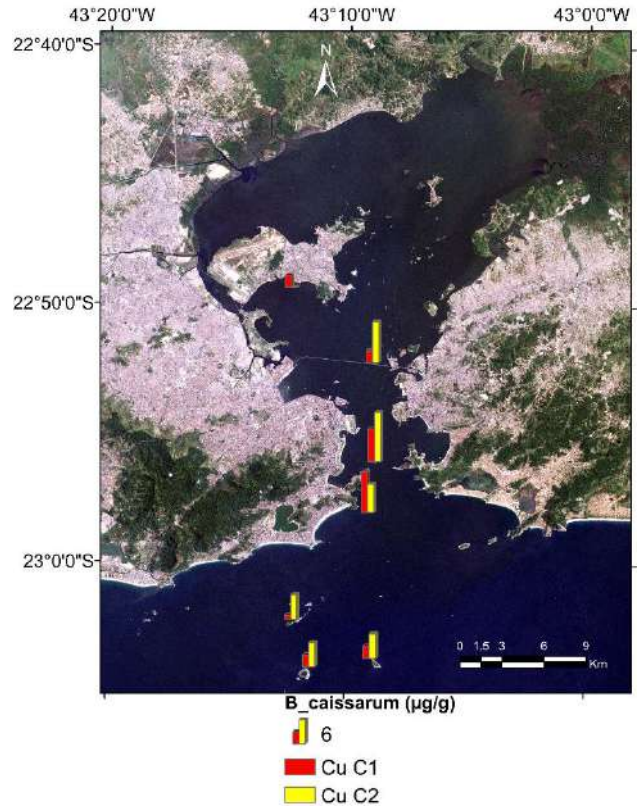
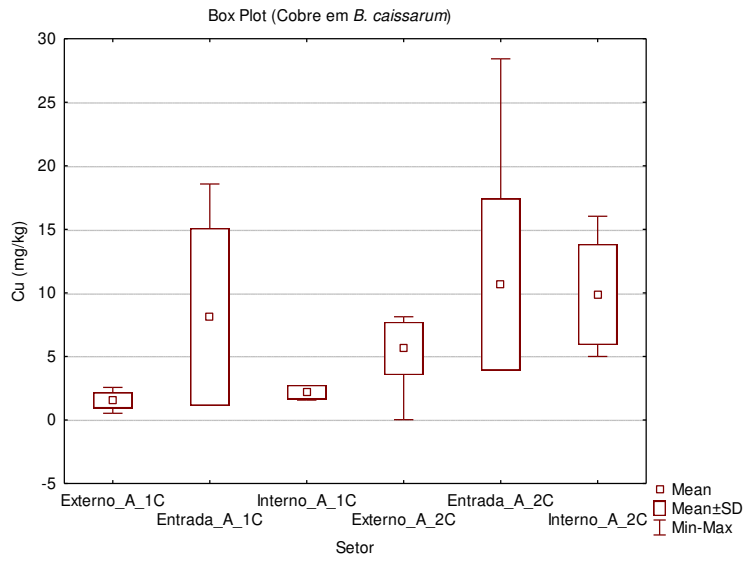


Figura 19 - Distribuição das concentrações de cobre (mg/kg) em *B. caissarum* (A) e *P. perna* (M) ao longo dos setores externo, entrada e interno nas amostragens 1C (2009) e 2C (2013).

4.4.1.9 Alumínio

O alumínio é um elemento conservativo de origem terrígena. Em geral suas concentrações são maiores próximo à regiões de maior aporte continental (Figuras 20 e 21 e Anexo 3) As concentrações de Al em *B. caissarum* e no MPS indicam, em geral, um gradiente de aumento das concentrações do setor externo para o setor interno. Assim, o Al estaria mais biodisponível para *B. caissarum* próximo às fontes continentais. *P. perna* não apresentou um padrão claro.

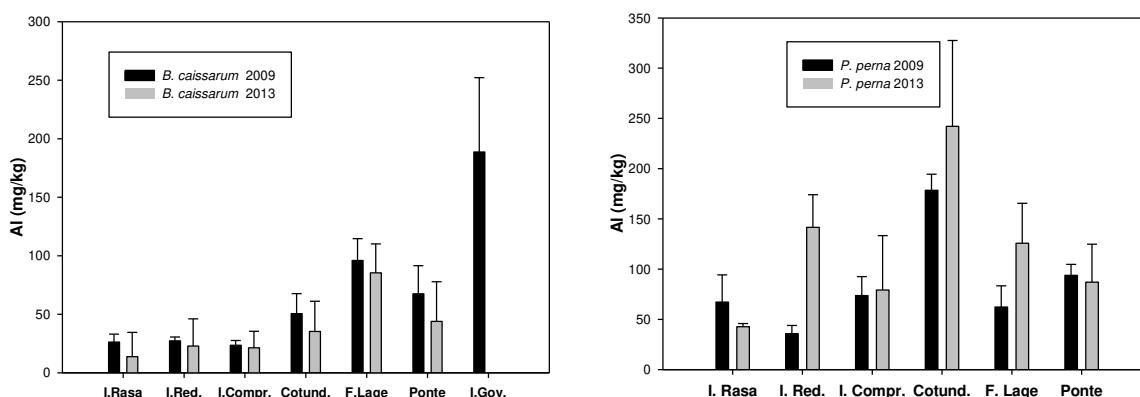


Figura 20 - Gráficos das médias e desvio padrão das concentrações de alumínio (mg/kg) em *Bunodosoma caissarum* e *Perna perna* ao longo das estações de amostragem.

De acordo com o teste Kruskal-Wallis, na amostragem de 2009 as concentrações de Al em *B. caissarum* não apresentaram diferenças significativas entre os setores interno e externo ($p=0,1180$) e entre os setores interno e entrada ($p=1,0000$), porém há diferença significativa entre os setores entrada e externo ($p=0,0051$). Já para a amostragem de 2013 não houve diferenças significativas entre os setores (teste de Kruskal-Wallis, $p>0,05$).

Na amostragem de 2009 não houve diferenças significativas entre os setores (teste de Kruskal-Wallis, $p>0,05$) para as concentrações de Al em *P. perna*. Já para a amostragem de 2013 somente houve diferença significativa entre os setores entrada e externo (teste de Kruskal-Wallis, $p=0,0054$).

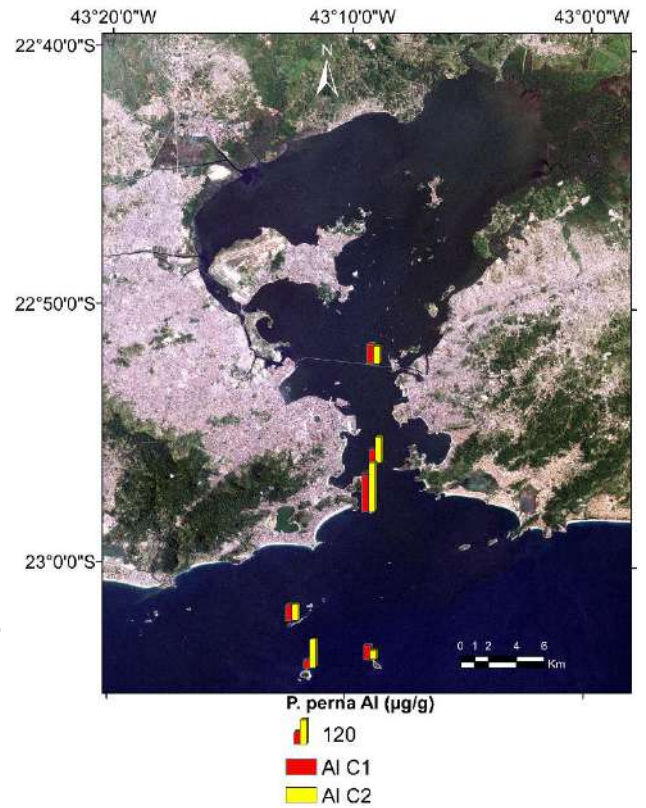
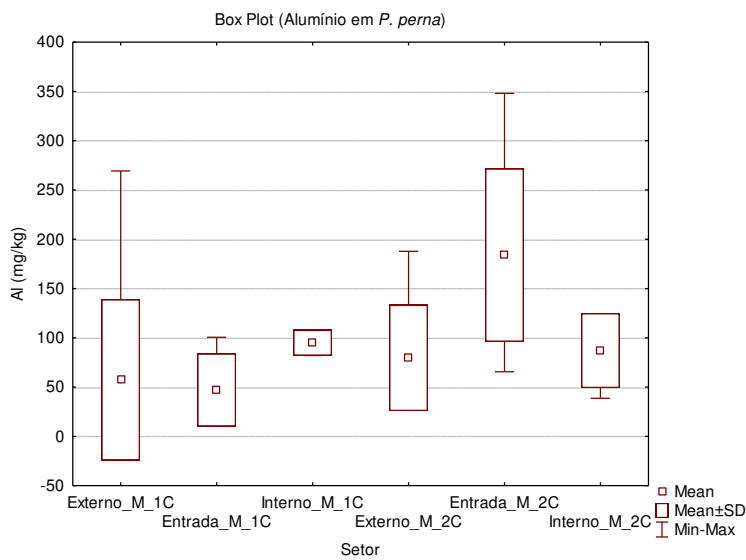
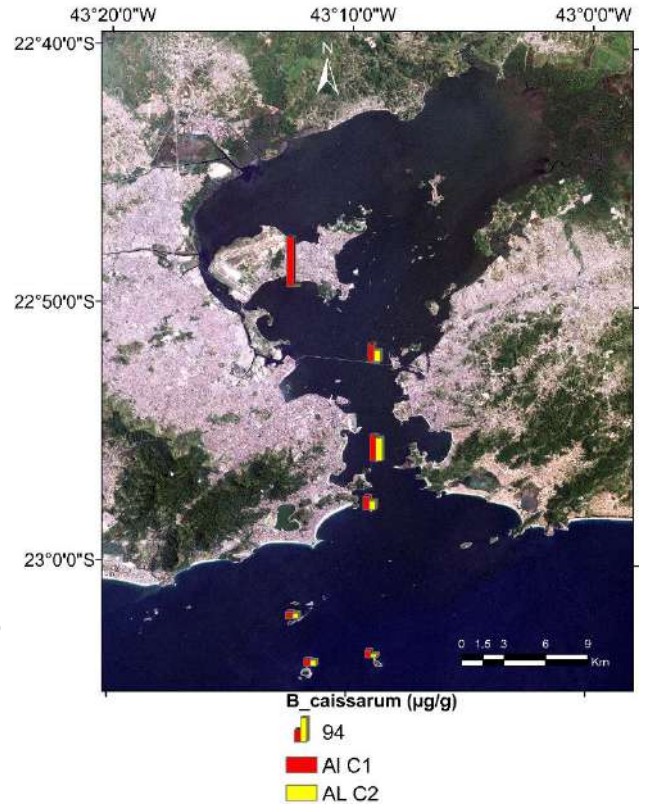
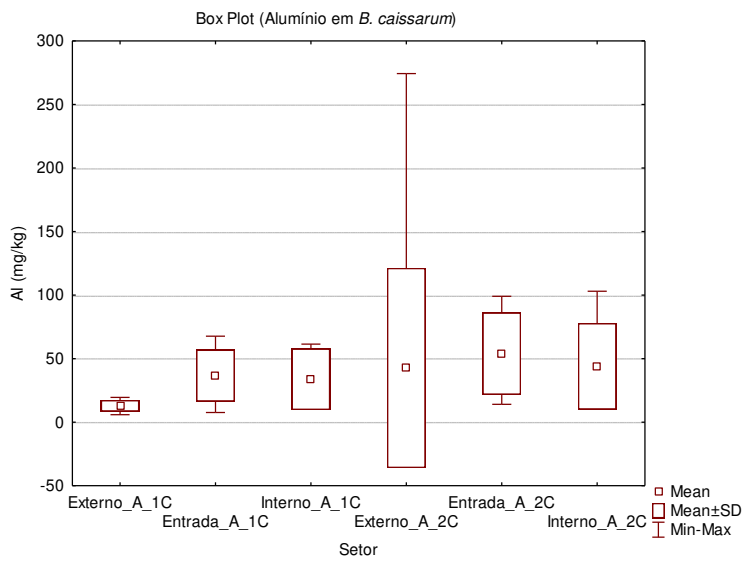


Figura 21 - Distribuição das concentrações de alumínio (mg/kg) em *B. caissarum* (A) e *P. perna* (M) ao longo dos setores externo, entrada e interno nas amostragens 1C (2009) e 2C (2013).

4.4.1.10 Titânio

As concentrações de Ti principalmente para *B. caissarum* e MPS apresentaram um gradiente de concentração crescente do setor externo para o setor interno (Figuras 22 e 23 e Anexo 3). O Ti, assim como o Al é um elemento conservativo. Foram observadas elevadas concentrações deste metal no material particulado, principalmente na parte interna na Baía de Guanabara (Anexo 3). Estas altas concentrações de titânio na porção interna da baía provavelmente são provenientes de material continental que chega à baía, já que este metal possui origem principalmente litogênica. Já as concentrações em *P. perna* demonstraram maiores níveis de Ti em Cotunduba, possivelmente devido à proximidade ao setor de disposição de material dragado.

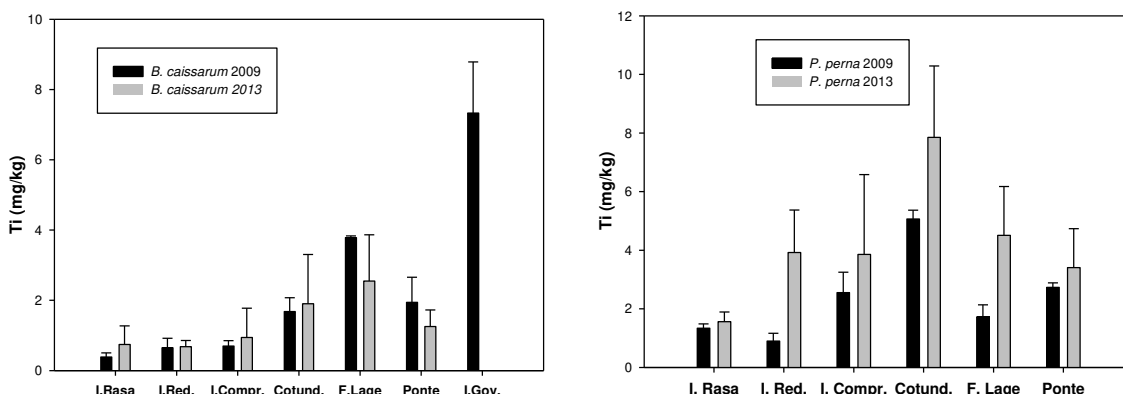


Figura 22 - Gráficos das médias e desvio padrão das concentrações de titânio (mg/kg) em *Bunodosoma caissarum* e *Perna perna* ao longo das estações de amostragem.

Na amostragem de 2009 as concentrações de Ti em *B. caissarum* somente foram significativamente diferentes entre os setores entrada e externo (teste de Kruskal-Wallis, $p=0,0054$), o mesmo ocorreu para a campanha de 2013 ($p=0,0102$).

De acordo com o teste Kruskal-Wallis, na amostragem de 2009 as concentrações de Ni em *P. perna* não apresentaram diferenças significativas entre os setores ($p>0,05$). Entretanto, para 2013 somente os setores externo e entrada ($p=0,0162$) foram significativamente diferentes.

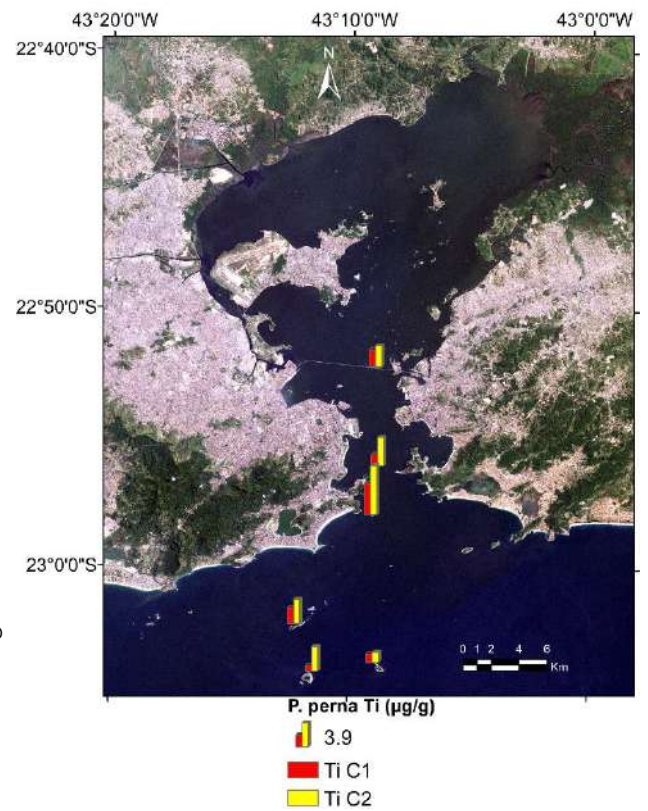
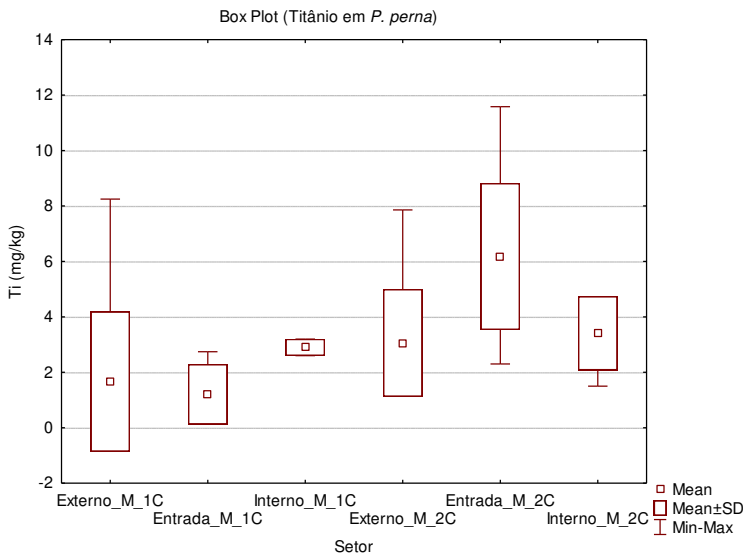
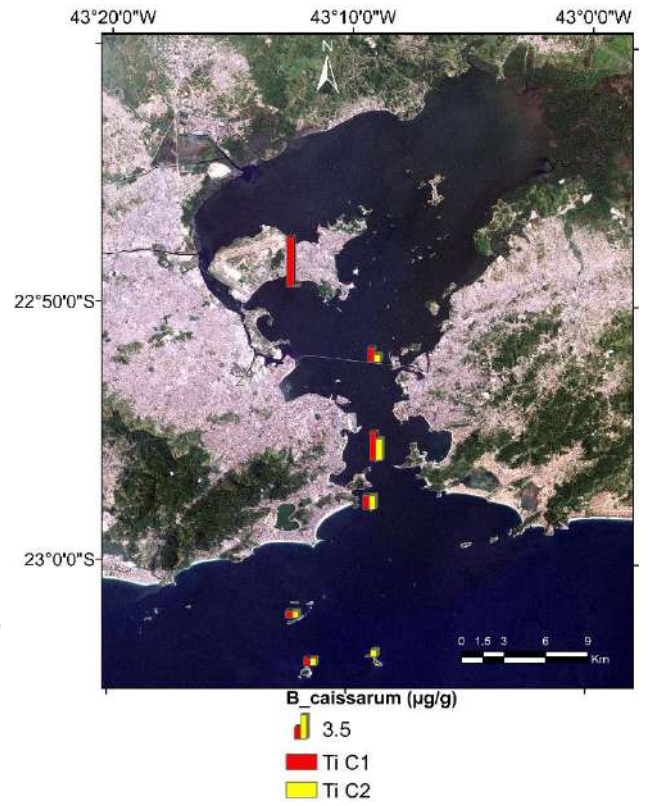
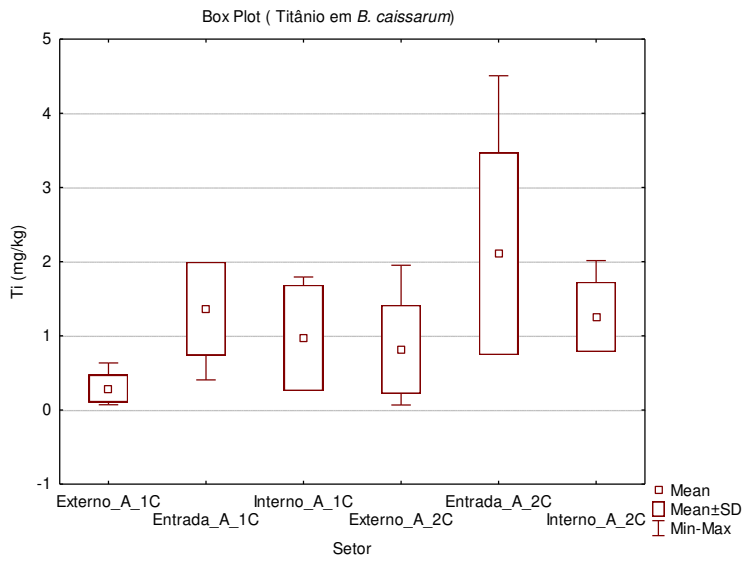


Figura 23 - Distribuição das concentrações de titânio (mg/kg) em *B. caissarum* (A) e *P. perna* (M) ao longo dos setores externo, entrada e interno nas amostragens 1C (2009) e 2C (2013).

4.4.1.11 Chumbo

Em 2009 as concentrações de chumbo no MPS (Anexo 3) oriundo do setor externo da Baía de Guanabara foram mais elevadas comparadas às encontradas no setor interno. Em 2013 o comportamento foi o oposto, ocorrendo um gradiente de aumento das concentrações de Pb do setor externo para o interno. Entretanto, os organismos estudados não apresentaram este mesmo comportamento, não demonstrando um padrão na distribuição das concentrações de Pb (Figuras 24 e 25).

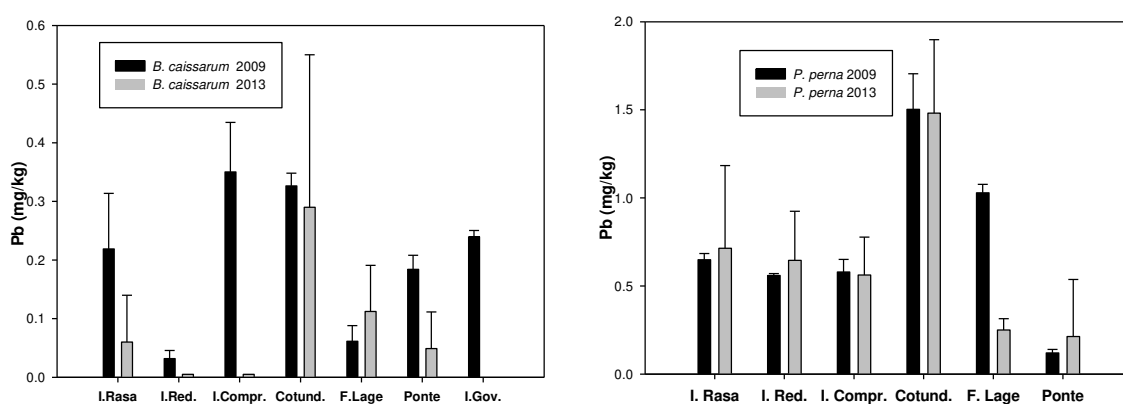


Figura 24 - Gráficos das médias e desvio padrão das concentrações de chumbo (mg/kg) em *Bunodosoma caissarum* e *Perna perna* ao longo das estações de amostragem.

O teste Kruskal-Wallis mostra que em ambas as amostragens não há diferenças significativas entre os setores ($p > 0,05$) para as concentrações de Pb em *B. caissarum*.

Na amostragem de 2009 as concentrações de Pb em *P. Perna* se mostraram significativamente diferentes somente entre os setores interno e entrada (teste de Kruskal-Wallis, $p = 0,0107$). No entanto, na amostragem de 2013 as concentrações de Pb se mostraram significativamente diferentes para os setores interno e externo (teste de Kruskal-Wallis, $p = 0,0416$) e para os setores entrada e interno (teste de Kruskal-Wallis, $p = 0,0453$).

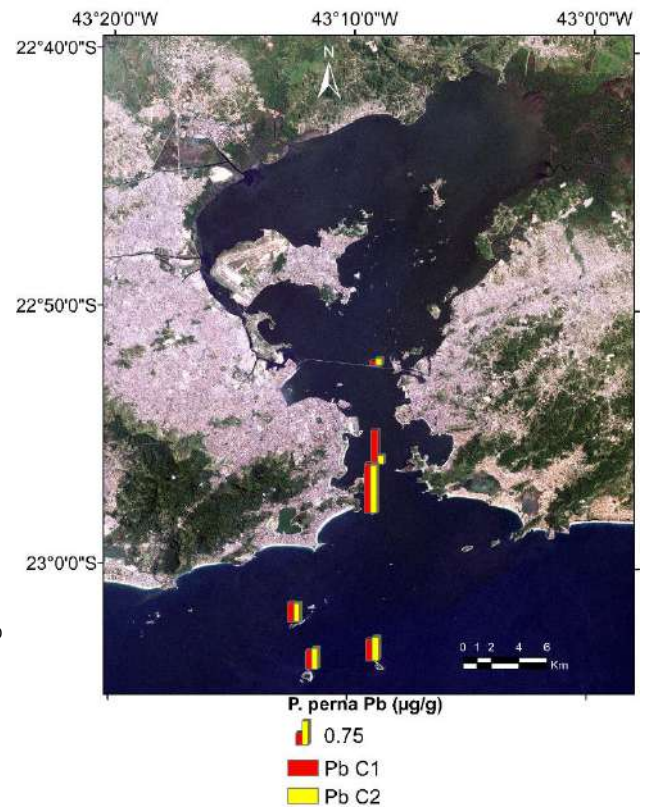
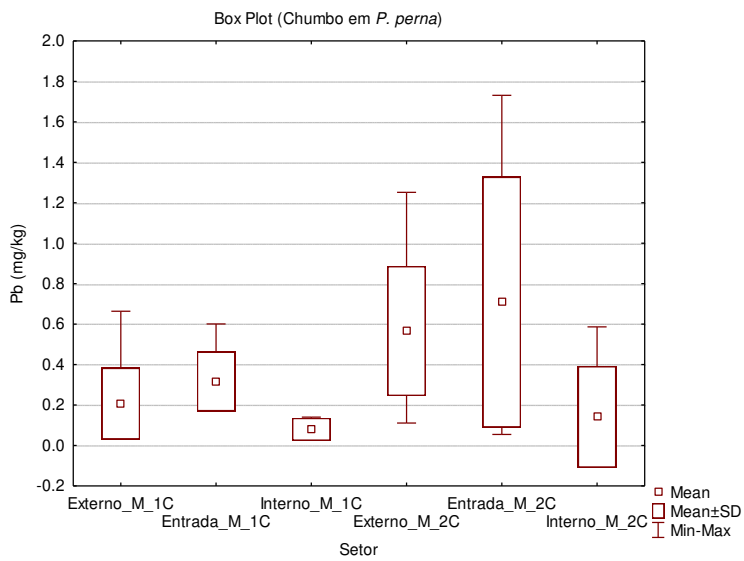
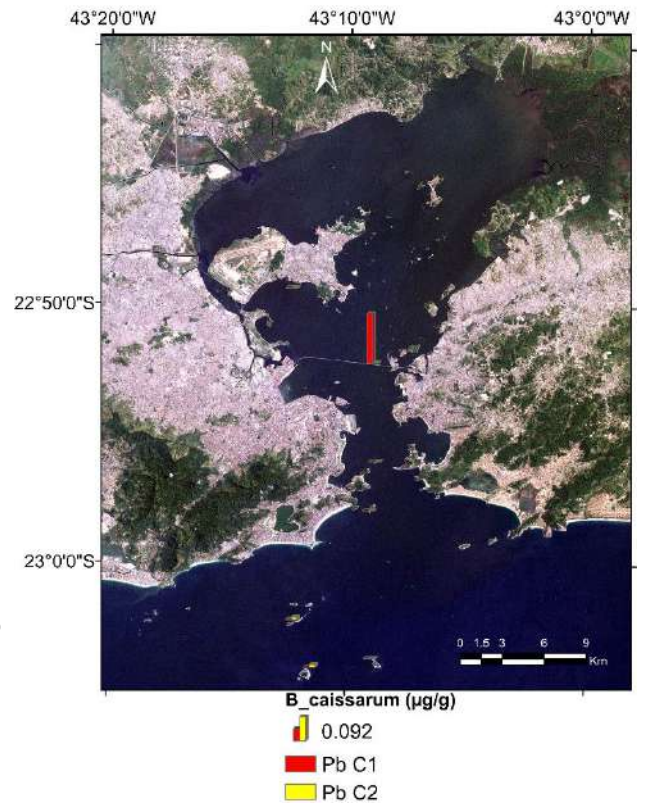
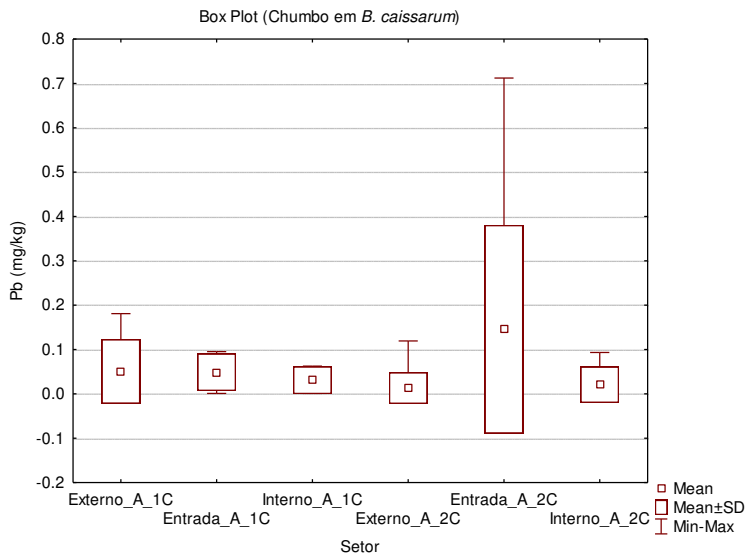


Figura 25 - Distribuição das concentrações de chumbo (mg/kg) em *B. caissarum* (A) e *P. perna* (M) ao longo dos setores externo, entrada e interno nas amostragens 1C (2009) e 2C (2013).

4.4.1.12 Cromo

As concentrações de Cr nos tecidos dos organismos na amostragem de 2013 apresentaram um expressivo aumento em relação a amostragem de 2009 (Figuras 26 e 27). Este aumento sugere alguma fonte substancial provavelmente próxima ao setor entrada da Baía de Guanabara, o qual apresentou maiores concentrações de Cr. Uma possibilidade é a ressuspensão de material dragado, tornando disponíveis compostos anteriormente imobilizados no sedimento. Francioni et al. (2004) encontrou em *P. perna* provenientes da baía concentrações de Cr de aproximadamente 100 mg/kg.

O limite máximo de cromo presente em alimentos (Anexo 4) permitido para o consumo humano é de 0,1 mg/kg (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1965). Todas as concentrações em *P. perna* neste trabalho ultrapassaram este limite. Este limite na legislação dos Estados Unidos da América, pela Food and Drug Administration (1993), é de 13 mg/kg (Anexo 1).

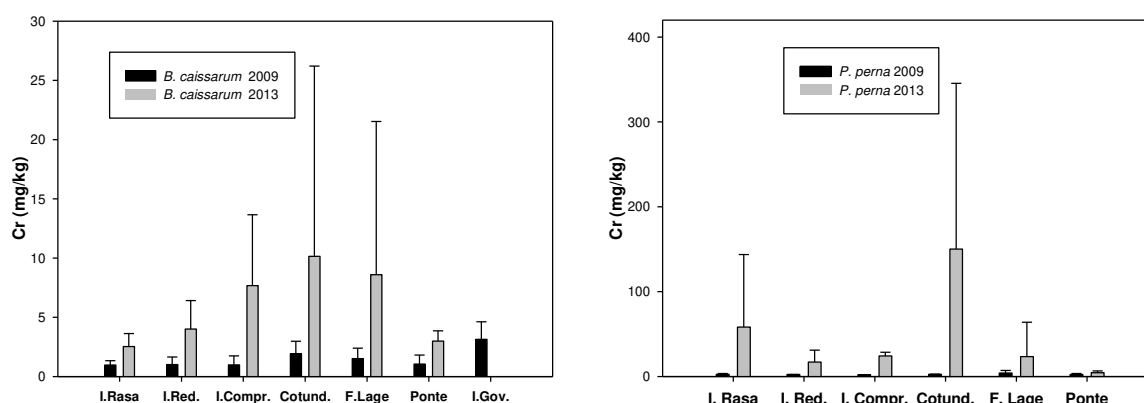


Figura 26 - Gráficos das médias e desvio padrão das concentrações de cromo (mg/kg) em *Bunodosoma caissarum* e *Perna perna* ao longo das estações de amostragem.

Não houve diferenças significativas para as concentrações de Cr em *B. caissarum* nos setores (teste de Kruskal-Wallis, $p > 0,05$) em ambas as campanhas amostrais. Para as concentrações de Cr em *P. perna* não houve diferenças significativas nos setores (teste de Kruskal-Wallis, $p > 0,05$) para a amostragem de 2009. Entretanto, para a amostragem de 2013 houve diferença significativa para as concentrações de Cr em *P. perna* entre os setores interno e externo (teste de Kruskal-Wallis, $p = 0,0297$) e entre os setores interno e entrada (teste de Kruskal-Wallis, $p = 0,0235$).

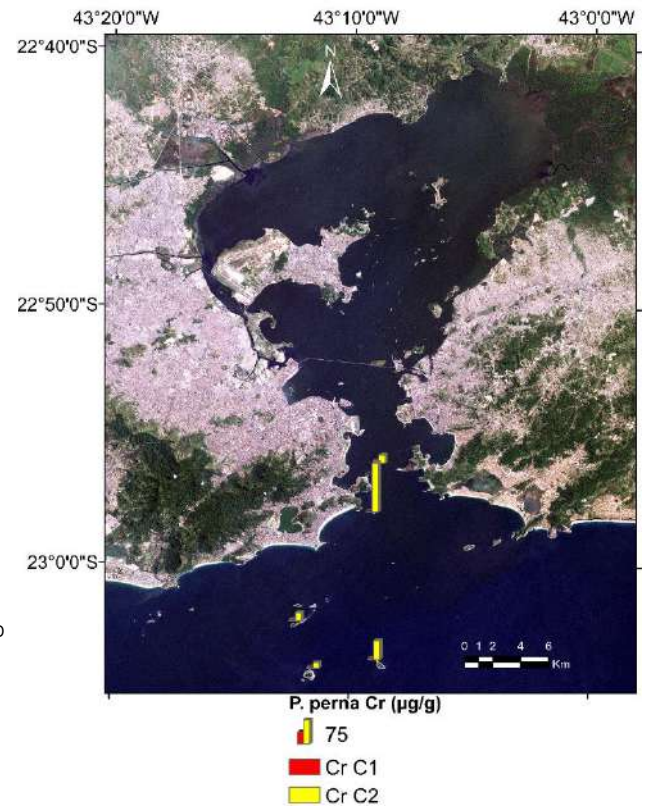
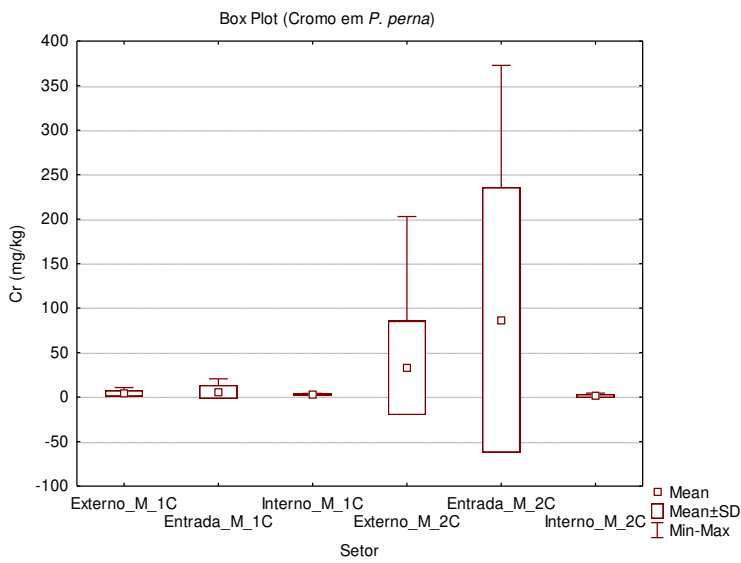
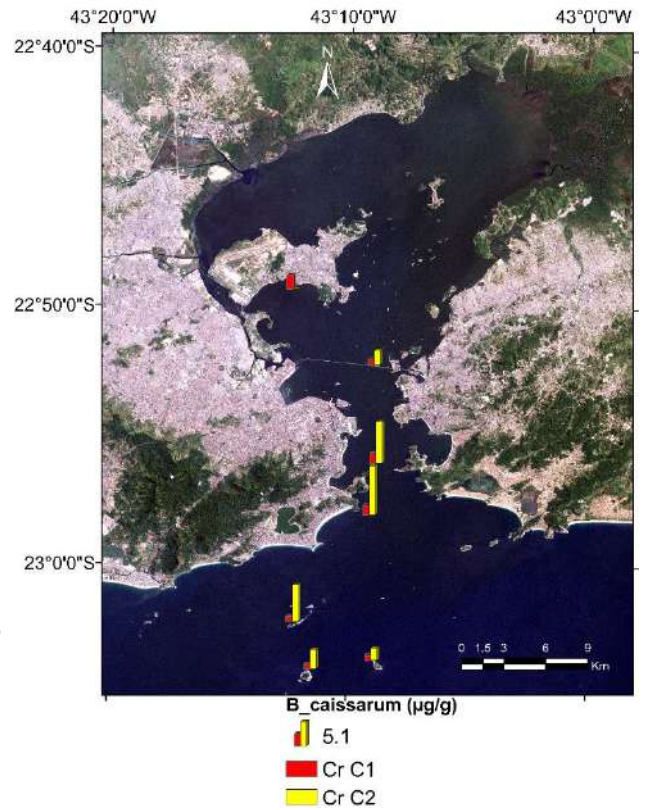
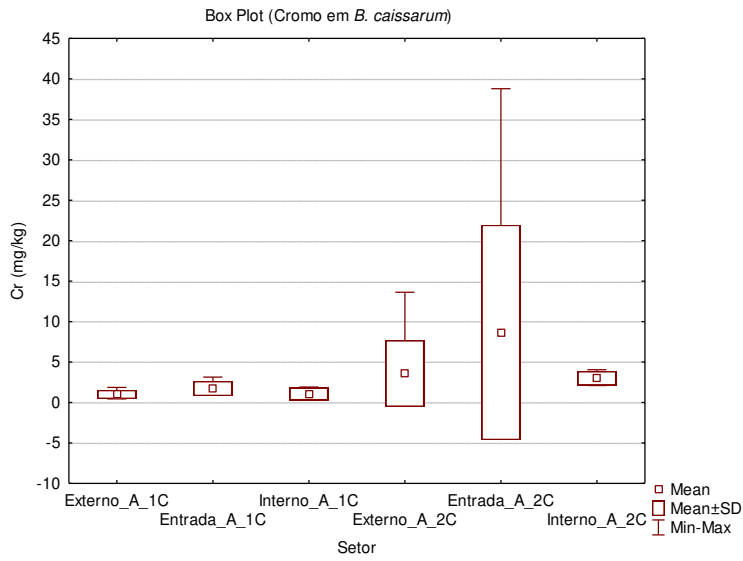


Figura 27 - Distribuição das concentrações de cromo (mg/kg) em *B. caissarum* (A) e *P. perna* (M) ao longo dos setores externo, entrada e interno nas amostragens 1C (2009) e 2C (2013).

4.4.1.13 Estanho

As concentrações de estanho para *B. caissarum* e o MPS apresentaram padrão similar, com concentrações crescentes do setor externo para o interno (Figura 28 e 29 e Anexo 3). Compostos que contêm estanho são muitas vezes utilizados na indústria naval e estas maiores concentrações no setor interno e entrada podem ser oriundas deste tipo de material devido ao intenso tráfego naval na Baía de Guanabara (FERNANDEZ et al., 2005).

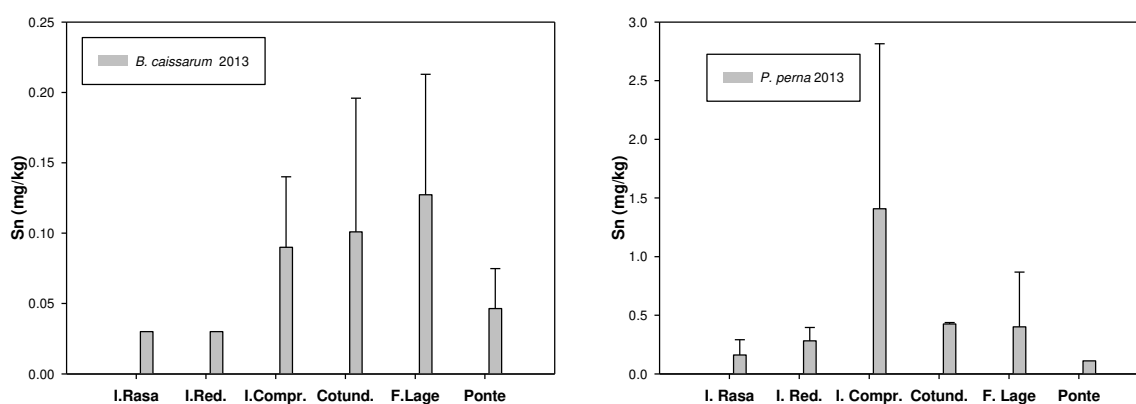


Figura 28 - Gráficos das médias e desvio padrão das concentrações de estanho (mg/kg) em *Bunodosoma caissarum* e *Perna perna* ao longo das estações de amostragem.

De acordo com o teste Kruskal-Wallis, na amostragem de 2013 as concentrações de Sn em *B. caissarum* e *P. perna* não apresentaram diferenças significativas entre os setores ($p > 0,05$).

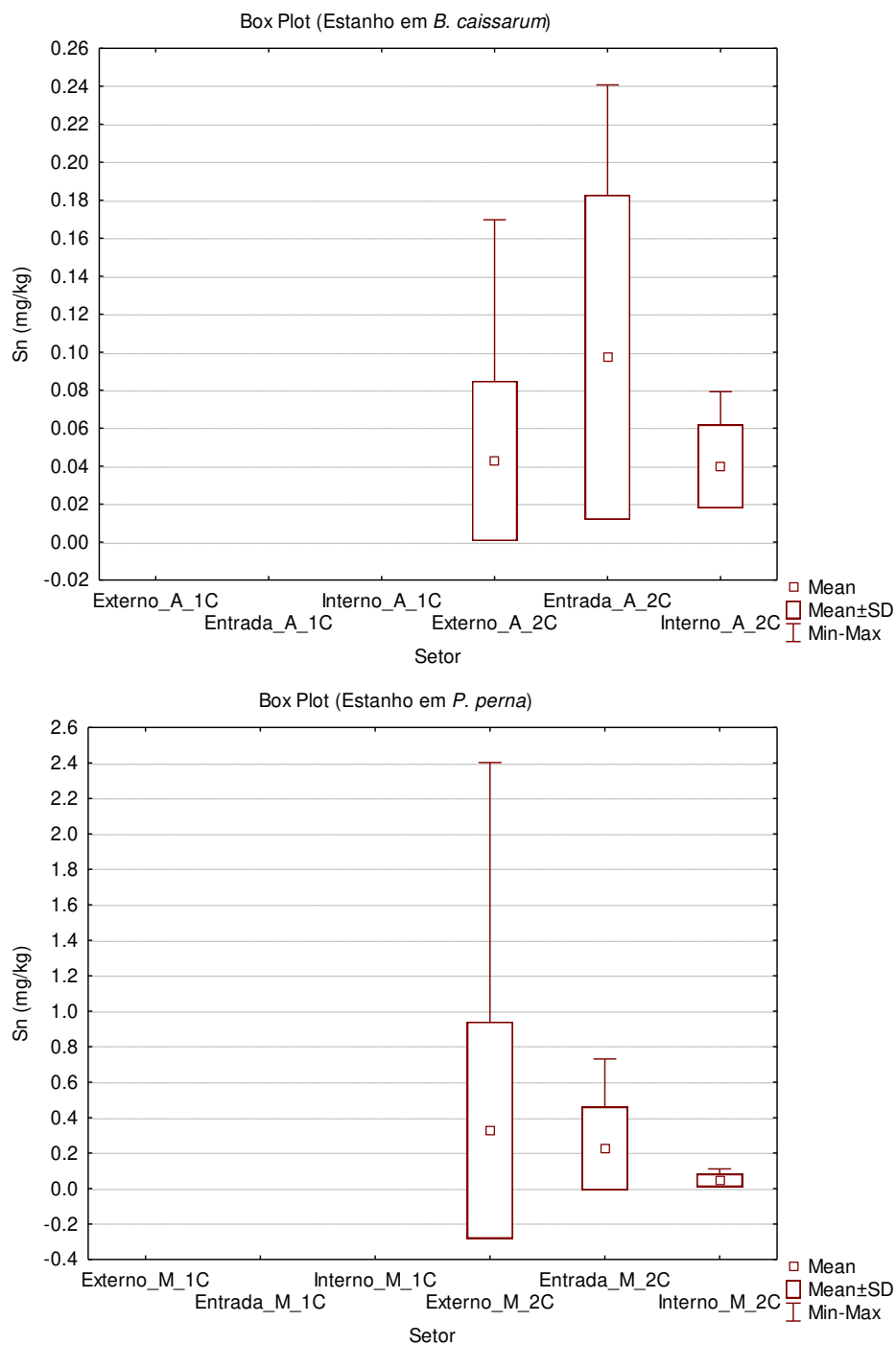


Figura 29 - Distribuição das concentrações de estanho (mg/kg) em *B. caissarum* (A) e *P. perna* (M) ao longo dos setores externo, entrada e interno na amostragem 2C (2013).

4.4.1.14 Níquel

Para níquel não foi possível observar um gradiente das concentrações (Figura 30 e 31). No entanto, pode-se observar um aumento das concentrações de níquel principalmente para *B. caissarum* em relação aos anos de 2009 e 2013. As concentrações de níquel encontradas nos tecidos dos organismos provavelmente refletem as concentrações biodisponíveis deste metal, já que este não tem função fisiológica conhecida na biota marinha (AMIARD et al., 1987; OLIVEIRA, 2003). As concentrações em *B. caissarum* amostrados em 2013 se mostraram mais elevadas principalmente na região próxima a entrada da Baía de Guanabara. As concentrações de níquel no MPS em 2013 se mostraram novamente elevadas na estação Forte da Lage (Anexo 3). Não há fontes de Ni conhecidas no local que pudessem explicar essa procedência. Entretanto, o níquel é um dos rejeitos gerados pela atividade petrolífera, principalmente como catalisadores (RICHARDSON et al., 1994; OLIVEIRA, 2003). Deste modo, uma hipótese é que este elevado nível de Ni poderia ser proveniente destas atividades e podem estar sendo disponibilizado para a coluna d'água através das atividades de dragagem que despejam material próximo a região.

O limite máximo de níquel presente em moluscos permitido para o consumo humano, em legislação dos Estados Unidos da América, pela Food and Drug Administration (1993), é de 80 mg/kg (Anexo4). Nenhuma das amostras de *Perna perna* ultrapassou este limite.

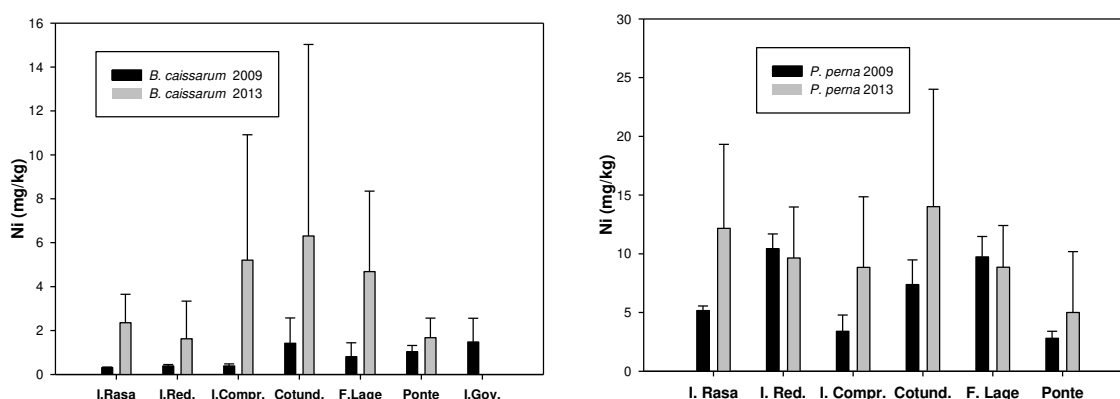


Figura 30 - Gráficos das médias e desvio padrão das concentrações de níquel (mg/kg) em *Bunodosoma caissarum* e *Perna perna* ao longo das estações de amostragem.

De acordo com o teste Kruskal-Wallis, na amostragem de 2009 as concentrações de Ni em *B. caissarum* foram significativamente diferentes entre os setores interno e externo ($p=0,0343$) e entre os setores externo e entrada ($p=0,0385$). Já para a amostragem de 2013 não houve diferenças significativas entre os setores ($p>0,05$). Para *P. perna* na amostragem de 2009 as concentrações de Ni foram significativamente diferentes entre os setores interno e entrada ($p=0,0162$). Para a amostragem de 2013 não houve diferenças significativas entre os setores ($p>0,05$).

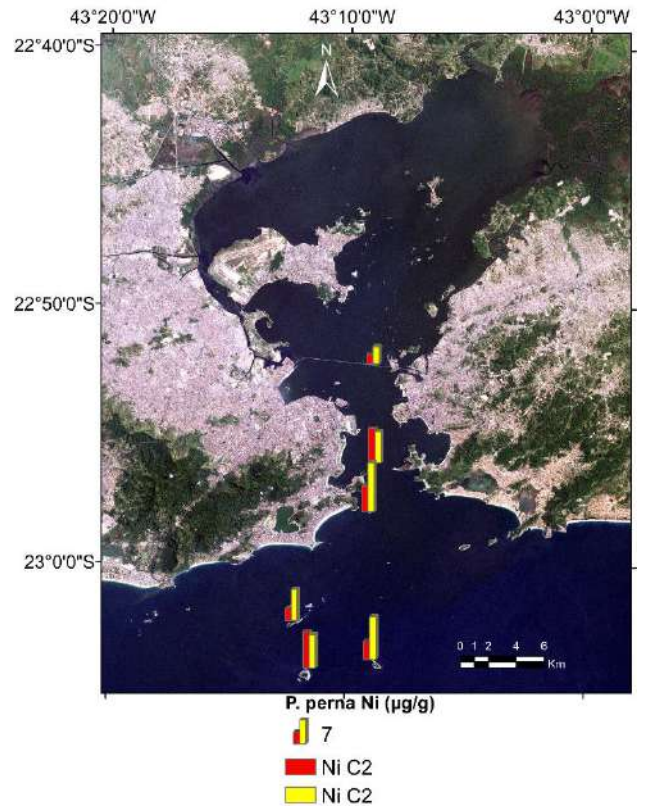
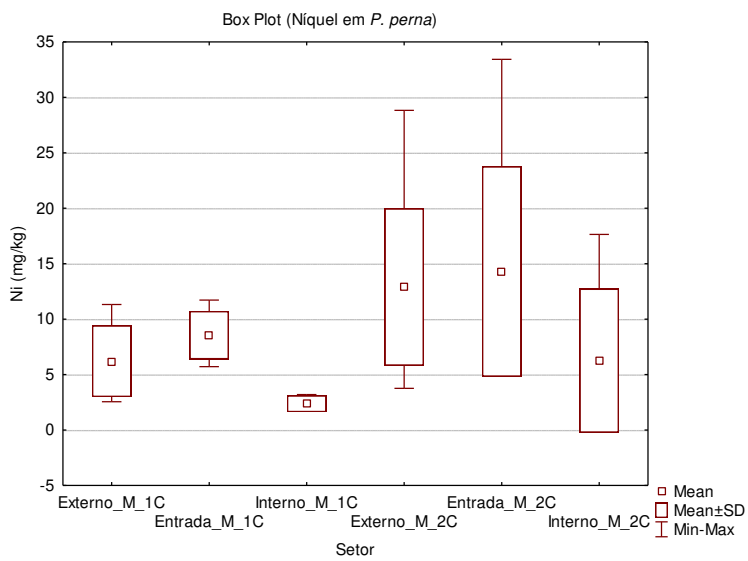
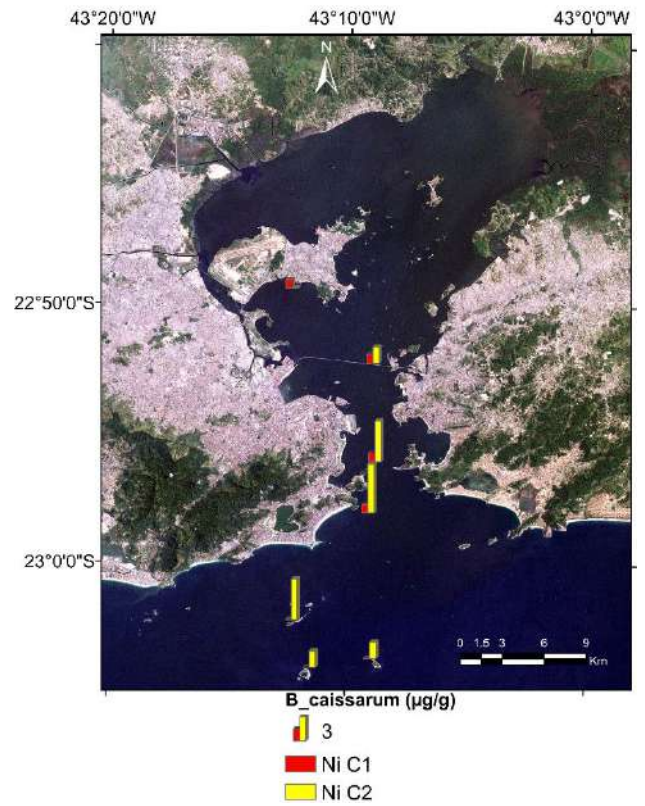
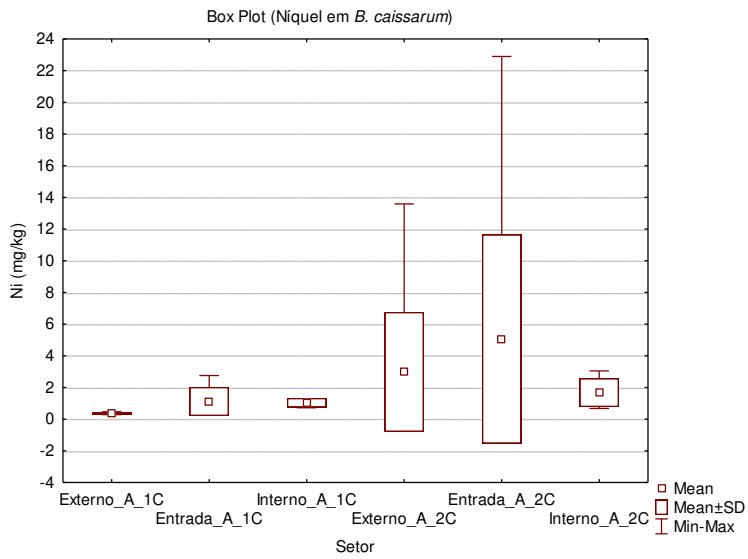


Figura 31 - Distribuição das concentrações de níquel (mg/kg) em *B. caissarum* (A) e *P. perna* (M) ao longo dos setores externo, entrada e interno nas amostragens 1C (2009) e 2C (2013).

4.4.1.15 Discussão integrada dos resultados

As concentrações de metais e As nos tecidos de *B. caissarum* e *P. perna* em geral apresentaram grande variabilidade espacial e temporal ao longo das estações de amostragem. Esta grande variabilidade das concentrações ocorre devido às inúmeras possíveis fontes na área de estudo, como os efluentes urbanos, tráfego de embarcações, a disposição de material dragado a qual remobiliza sedimentos, etc. As concentrações nas espécies estudadas em geral não são similares devido às diferentes fisiologias e hábitos alimentares que estas possuem. Estas se mostraram, em geral, maiores em *Perna perna* do que em *B. caissarum*, exceto para o arsênio e o bário.

A partir da Análise de Componentes Principais (PCA) das concentrações de metais e As em *B. caissarum* pode-se notar, na Figura 32 e na matriz de correlação (Anexo 5), que para a amostragem de 2009 de acordo com o fator 1, que representa 44,03% da variabilidade dos dados, houve uma associação positiva significativa entre o Cd e o Ba. Estes metais apresentaram comportamento similar na campanha amostral de 2009, com maiores concentrações nos tecidos de *B. caissarum* provenientes da região insular adjacente à Baía de Guanabara indicando haver fontes destes metais na região e/ou maior biodisponibilidade em condições de maior salinidade. O fator 2 mostrou associações positivas significativas com Al, Fe, Mn, Ti e Zn. Este fator parece estar associado a aportes continentais de origem litogênica. Já para a amostragem de 2013 de acordo com o fator 1, que representa 29,17% da variabilidade dos dados, somente houve associação positiva significativa com o Cd, o qual não apresentou correlação positiva significativa com nenhum outro metal. O fator 2 mostrou associações positivas significativas com Al, As, Ti, Zn, Sn, Ba e Pb demonstrando uma mistura de fontes.

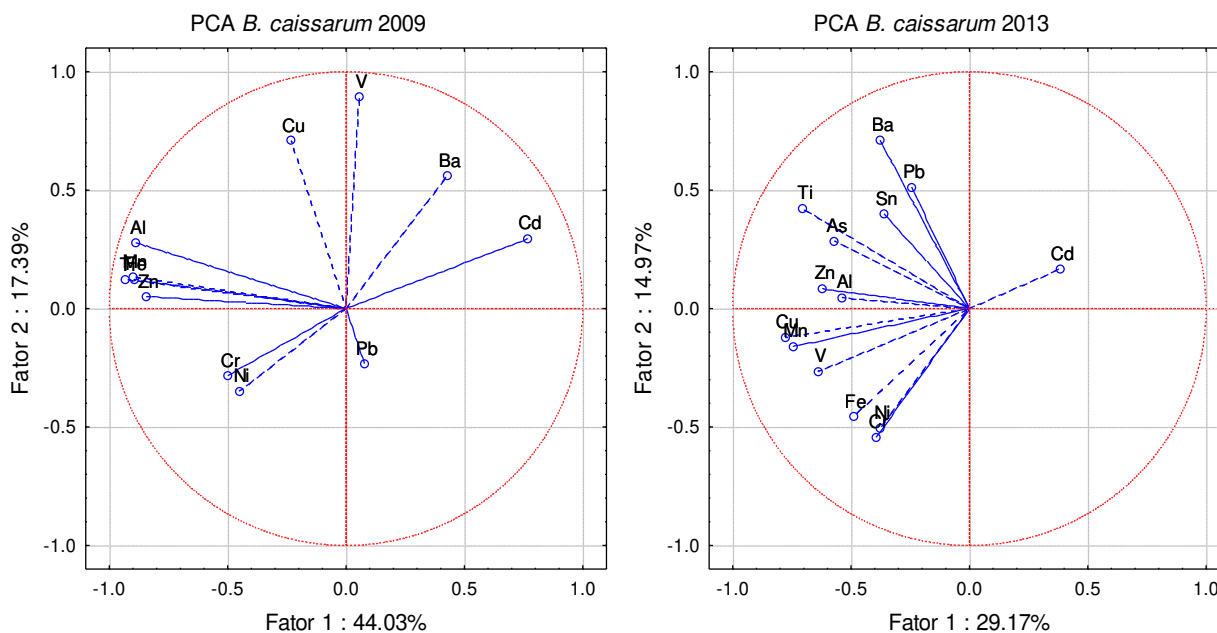


Figura 32 - Análise de componentes principais das concentrações de metais e arsênio em *B. caissarum* para as amostragens de 2009 e 2013.

A partir da Análise de Componentes Principais das concentrações de metais em *P. perna*, pode notar-se na Figura 33 e na matriz de correlação (Anexo 6), que para a amostragem de 2009 de acordo com fator 1, que representa 62,20% da variabilidade dos dados, apresentou correlação positiva significativa para Cd e V. Estes dois elementos apresentaram correlação positiva significativa entre si e demonstraram comportamento similar com maiores concentrações na região insular adjacente a Baía de Guanabara. Isto indica que há fontes destes metais na região e/ou maior biodisponibilidade em condições de maior salinidade. Para o fator 2, Cr, Fe, Mn, Ni e Zn apresentaram associações positivas significativas demonstrando uma mistura de fontes. Já para a amostragem de 2013 de acordo com o fator 1, que representa 37,79% da variabilidade dos dados, houve associação positiva significativa com o Ba e o Mn, os quais não apresentaram correlação positiva significativa entre si. O fator 2 mostrou associações positivas significativas com As, Cd, V e Zn. As, Cd e V apresentaram correlação positiva significativa entre si. Estes quatro elementos mostraram comportamento similar para *P. perna* na amostragem de 2013, com maiores concentrações na região insular adjacente à baía, demonstrando haver fontes destes metais e de arsênio na região e/ou maior biodisponibilidade em condições de maior salinidade.

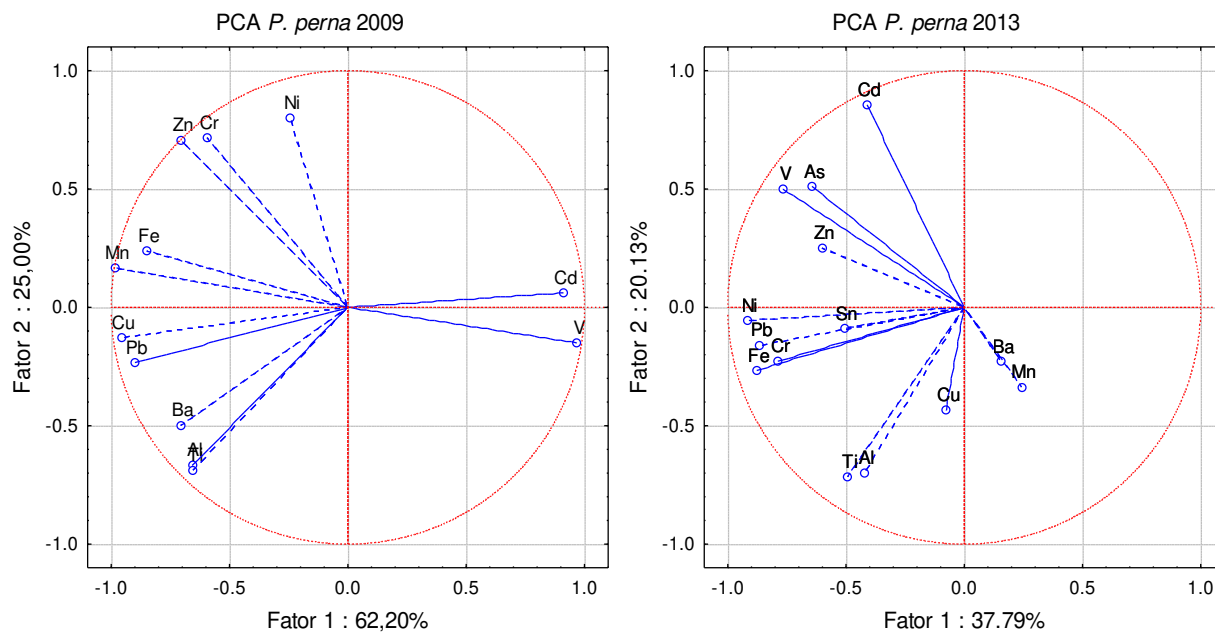


Figura 33 - Análise de componentes principais das concentrações de metais e arsênio em *P. perna* para as amostragens de 2009 e 2013.

De acordo com as análises do Teste U de Mann-Whitney (Tabela 5) as concentrações de Al, Cu, Fe e Ti não apresentaram diferenças significativas entre as duas espécies para o número amostral na amostragem de 2009. Já para a amostragem de 2013 as concentrações de Ba, Fe e Zn não apresentaram evidência estatística de diferença entre os grupos (*B. caissarum* e *P. perna*). Somente o comportamento do Fe foi similar para *B. caissarum* e *P. perna* nas duas amostragens.

Tabela 5 - Teste U de Mann-Whitney entre as médias das concentrações de cada metal encontrado nos tecidos de *Bunodosoma caissarum* e as concentrações do mesmo metal encontradas em *Perna perna* nas amostragens de 2009 e 2013. Os resultados assinalados são significativos a $p < 0,05$

Metais <i>B. caissarum</i> x metais <i>P. perna</i>	Teste U de Mann-Whitney (p) Amostragem 2009	Teste U de Mann-Whitney (p) Amostragem 2013
Alumínio	0,12	$p < 0,05$
Arsênio	-	$p < 0,05$
Bário	$p < 0,05$	0,40
Cádmio	$p < 0,05$	$p < 0,05$
Chumbo	$p < 0,05$	$p < 0,05$
Cobre	0,251	$p < 0,05$
Cromo	$p < 0,05$	$p < 0,05$
Estanho	-	$p < 0,05$
Ferro	0,61	0,71
Manganês	$p < 0,05$	$p < 0,05$
Níquel	$p < 0,05$	$p < 0,05$
Titânio	0,17	$p < 0,05$
Vanádio	$p < 0,05$	$p < 0,05$
Zinco	$p < 0,05$	0,06

A Análise de Agrupamentos (Figura 34), que utiliza a distância euclidiana das médias das concentrações de cada elemento em *Bunodosoma caissarum*, demonstra a formação de dois grupos de estações de amostragem em 2009 e também em 2013. Na amostragem de 2013 o primeiro grupo é formado pelas estações Ponte Rio-Niterói, Forte da Lage e Cotunduba, que apresentam similaridade, porém as duas primeiras apresentaram maior similaridade entre si. O segundo grupo mostra que as estações Ilha Rasa e Ilha Redonda apresentaram alta similaridade e que nestas estações *Bunodosoma caissarum* apresentou um comportamento de acumulação de metais similar na Ilha Comprida, embora tenha sido uma similaridade um pouco menor. Praticamente o mesmo padrão ocorreu para a amostragem de 2009. A maior diferença entre 2009 e 2013 é que em 2009 havia uma estação a mais, a Ilha do Governador. Outro fator que pode ser observado é que as estações Forte da Lage e Ponte Rio-Niterói apresentaram maior similaridade em 2009.

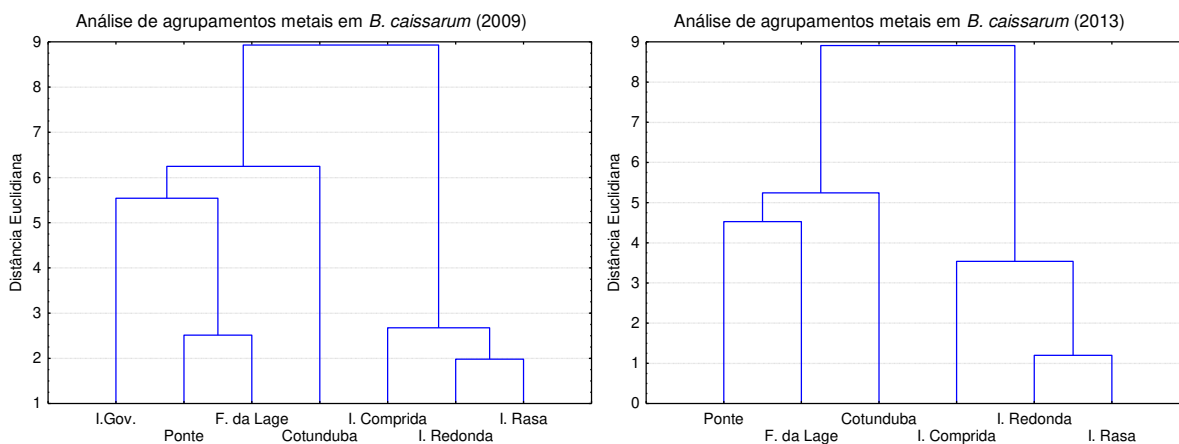


Figura 34 - Análise de agrupamentos das médias das concentrações de metais em *B. caissarum* ao longo das estações de amostragem (Método Wards). Amostragem 2009 e 2013.

A partir da Análise de Agrupamentos (Figura 35), que utiliza a distância euclidiana das médias das concentrações de cada elemento em *Perna perna*, pode-se observar a formação de dois grupos de estações de amostragem em 2009 e três grupos em 2013. Na amostragem de 2013, a estação Cotunduba não apresentou alta similaridade com nenhuma outra estação. No entanto, as estações Ponte Rio-Niterói e Forte da Lage apresentaram alta similaridade entre si. O segundo grupo mostra que as estações Ilha Redonda e Ilha Comprida apresentaram alta similaridade e que nestas estações *Perna perna* apresentou um comportamento de acumulação de metais similar na Ilha Rasa, embora tenha sido uma menor similaridade. A Análise de Agrupamentos para as concentrações de metais nos tecidos de *P. perna* em relação às estações na amostragem de 2013 não apresentou padrão similar ao de 2009 como ocorreu para *B. caissarum*. Em 2009 as estações Ilha Rasa e Ilha Comprida apresentaram alta similaridade e nestas estações *P. perna* apresentou comportamento de acumulação de metais similar à Ilha Redonda, embora tenha sido uma menor similaridade. Além disso, Forte da Lage e Cotunduba apresentaram similaridade maior do que a observada em 2013.

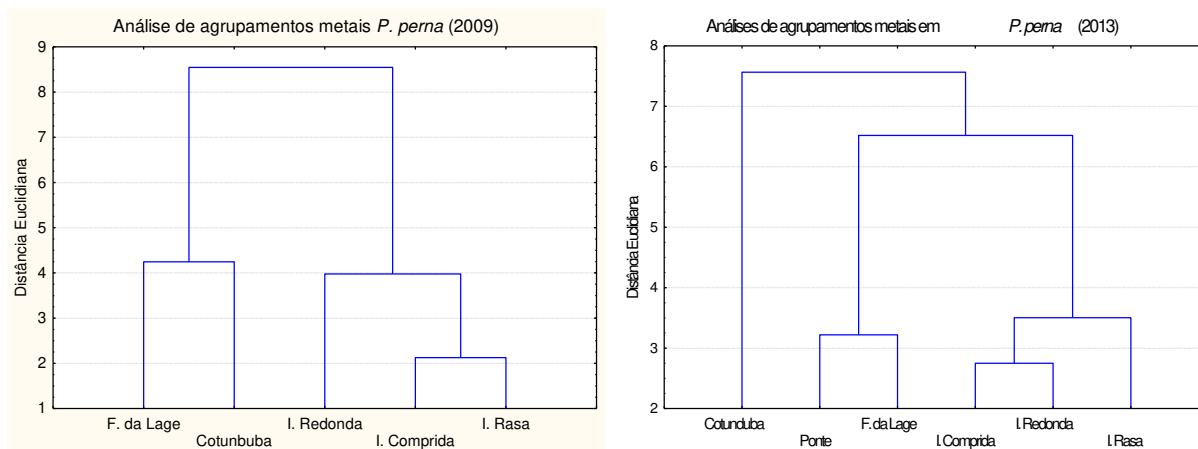


Figura 35 - Análise de agrupamentos das médias das concentrações de metais em *P. perna* ao longo das estações de amostragem (Método Wards). Amostragem 2009 e 2013.

Os estudos de concentrações de metais em *P. perna* e *B. caissarum* puderam ser utilizados a fim de se comparar concentrações de diversos metais encontradas em 2009 e em 2013 em estações na Baía de Guanabara e na região insular adjacente. Com isso, pôde-se observar se houve alguma tendência de aumento ou redução das concentrações destes metais após aproximadamente três anos.

De acordo com Rainbow (2002) todos os invertebrados aquáticos são capazes de bioacumular metais e geralmente há uma grande variabilidade entre as concentrações nos tecidos entre os diferentes táxons e os diferentes metais. Esta variabilidade foi observada entre as espécies *B. caissarum* e *P. perna* utilizadas no presente estudo. As concentrações dos metais encontradas nos tecidos dos organismos mostraram-se, em geral, maiores nos espécimes de *Perna perna* do que nos de *Bunodosoma caissarum*, exceto para o As e Ba. Porém, este fator (maiores ou menores concentrações nos tecidos) não interfere no uso de uma espécie para o biomonitoramento. O que possibilita a utilização de determinada espécie para o biomonitoramento é o conhecimento das características de biocumulação da espécie utilizada e que a espécie apresente características essenciais de um organismo biomonitor, como ser sésil, abundante e refletir as concentrações as quais são expostas no ambiente.

Estudos quanto a concentração de metais nos tecidos de *P. perna*, principalmente, e de *B. caissarum* foram realizados anteriormente (Tabelas 6 e 7). *P. perna* é tradicionalmente utilizado em estudos de biomonitoramento. Já *B. caissarum* foi pouco estudada como espécie biomonitora. Rizzini-Ansari (2009) determinou as

concentrações de Hg nos tecidos de *B. caissarum* e também de *P. perna* em estações de amostragem similares às utilizadas neste capítulo do presente estudo e as concentrações de Hg observadas não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as espécies. Estes resultados poderiam indicar um similar potencial para o uso destas espécies como biomonitoras da contaminação por Hg.

Para a aplicação de espécies para estudos de biomonitoramento é necessário que se conheça suas características de assimilação de metais. No entanto, encontra-se somente um estudo sobre a realização de experimentos de incorporação de metais por *B. caissarum*, no qual Gouvea et al. (1985) realizaram incubações com os radionuclídeos ^{137}Cs , ^{131}I , ^{133}Ba , ^{51}Cr (III e VI), ^{60}Co e ^{65}Zn por 24 horas. Apesar de *P. perna* ter sido utilizado em diversos estudos de biomonitoramento, há pouco material publicado caracterizando a bioacumulação de metais utilizando esta espécie, como os estudos de Anandraj et al. (2002) e Malagrino (2003) com Hg. Portanto, há a necessidade da realização de experimentos de microcosmos com *B. caissarum* e *P. perna* com a adição de metais de interesse ambiental e ecotoxicológico para o biomonitoramento que possibilitem o melhor conhecimento da incorporação de metais por estas espécies e a aplicação destas para estudos de monitoramento. Desta forma, no presente estudo decidiu-se realizar incubações de espécimes de *B. caissarum* e *P. perna* com o Cd, o Hg e o Zn, para que se compreenda melhor as características de bioacumulação destes metais por estas espécies. Estes metais foram escolhidos pois apresentam características distintas e relevância ecotoxicológica. O Cd e o Hg são metais não-essenciais, já o Zn é um metal essencial. O Hg, apesar de não ser essencial assim como o Cd, foi escolhido para este estudo por apresentar um ciclo especialmente complexo em ambientes aquáticos.

Anteriormente ao início dos estudos de incubações de *B. caissarum* e *P. perna* com Hg, Cd e Zn foi realizado um experimento preliminar para testar a resistência destas espécies às condições de aquários em ambiente de laboratório. Neste experimento foi observado que para que espécimes de *P. perna* sobrevivam à estas condições devem haver renovações periódicas da água-do-mar dos aquários e baixas temperaturas. Já *B. caissarum* apresentou grande resistência à vida em aquários sem renovação de água, sobrevivendo por mais de quatro meses em aquário sem renovação de água, somente com aeração. Após este período os espécimes de *B. caissarum* foram devolvidos ao mar. Este experimento demonstrou que *B. caissarum* é uma espécie bastante tolerante às condições de altos níveis de matéria orgânica e

turbidez da água e de temperaturas mais altas. Provavelmente por este motivo esta espécie apresenta uma distribuição mais abrangente na Baía de Guanabara do que *P. perna*.

Tabela 6 - Médias das concentrações em mg kg⁻¹ (peso seco) de metais em *Perna perna* em diferentes locais do Estado do Rio de Janeiro

Local	Al	Ba	Cd	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Ni	Pb	Ti	V	Zn
Baía de Guanabara (a)	-	-	-	-	9,1	162	-	21,9	8,2	6,45	-	-	252
Baía de Guanabara (b)	-	-	0,1	-	12	-	-	15	4	3	-	-	150
Baía de Guanabara (c)	-	-	0,1	-	10	-	-	17	6	2	-	-	150
Baía de Guanabara(d)*	-	-	0,14	0,24	5,77	-	-	-	-	-	-	-	122
Baía de Guanabara (e)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-
Arraial do Cabo (b)	-	-	1,6	-	8	-	-	10	17	-	-	-	180
Baía de Sepetiba (b)	-	-	1,2	-	8	-	-	20	7	13	-	-	250
Angra dos Reis (b)	-	-	1,2	-	9	-	-	10	10	2	-	-	200
Macaé (f)	1317	-	0,38	1,25	5,1	567	-	8,2	8,9	1,8	-	-	83
Baía de Guanabara (g)	-	-	-	-	-	-	35x10 ⁻³	-	-	-	-	-	-
Baía de Guanabara (h)	-	-	-	-	-	-	35,3x10 ⁻³	-	-	-	-	-	-
Baía de Guanabara (i)	-	-	-	-	-	-	15x10 ⁻³	-	-	-	-	-	-

(a) Rezende e Lacerda, 1986; (b) Carvalho et al., 1991; (c) Carvalho e Lacerda, 1992; (d) Francioni, 1997; (e) Maia et al., 2006; (f) Carvalho et al., 2001; (g) Costa et al., 2000; (h) Kehrig et al., 2002 e (i) Rizzini-Ansari, 2009. * Concentração convertida para peso seco.

Tabela 7- Médias das concentrações em mg kg⁻¹ (peso seco) de metais em *Bunodosoma caissarum* na Baía de Guanabara e na área externa à baía

Local	Al	Ba	Cd	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Ni	Pb	Ti	V	Zn
Baía de Guanabara (a)	-	-	0,1	-	8	-	-	10	0,8	-	-	-	120
Baía de Guanabara (b)	-	-	0,15	-	10	-	-	13	0,7	1,5	-	-	91
Baía de Guanabara (c)	-	-	-	-	-	-	16x10 ⁻³	-	-	-	-	-	-

(a) Carvalho et al., 1991; (b) Carvalho e Lacerda, 1992 e (c) Rizzini-Ansari, 2009.

5 BIOACUMULAÇÃO DE MERCÚRIO POR *B. CAISSARUM* E ESTUDOS DE ESPECIAÇÃO DE MERCÚRIO

5.1 INTRODUÇÃO

O metal mercúrio (Hg) é naturalmente presente em baixas concentrações em ambientes aquáticos. No entanto, durante o último século as atividades antropogênicas aumentaram os níveis de Hg na biosfera cerca de três vezes. Esse aumento resultou no enriquecimento de Hg nos oceanos, principalmente em águas superficiais, as quais trocam diretamente Hg com a atmosfera (MASON et al., 2012). O mercúrio pode ser um contaminante perigoso, embora seus efeitos ecológicos e toxicológicos sejam altamente dependentes das espécies químicas presentes no ambiente (ULLRICH et al., 2001). O ciclo biogeoquímico do Hg em ambientes aquáticos é bastante complexo e é controlado por fatores físicos, químicos e biológicos. Os fatores biológicos são governados principalmente pela atividade de microrganismos (CORREIA et al., 2012b; COSSA et al., 2011; HEIMBURGER et al., 2010; ULLRICH et al., 2001). Desta forma, é difícil prever o comportamento das espécies de Hg em águas naturais. As principais formas de mercúrio na água do mar são Hg⁰, complexos de Hg²⁺ com ligantes orgânicos e inorgânicos e espécies orgânicas, como o metilmercúrio (MeHg) e o dimetilmercúrio (HORVAT et al., 2003). Dependendo das condições ambientais presentes, o mercúrio inorgânico pode ser convertido em formas metiladas mais tóxicas, como o MeHg (CORREIA et al., 2012b; DRISCOLL et al., 2012; GUIMARÃES et al., 2000a; RIBEIRO GUEVARA et al., 2008; ULLRICH et al., 2001). Apesar da vasta literatura sobre o comportamento do Hg em ambientes aquáticos, incluindo mecanismos de transformação e distribuição, ainda há lacunas a se elucidar nessa área (RIBEIRO GUEVARA et al., 2008, 2007; TESSIER et al., 2007; ULLRICH et al., 2001; ŽAGAR et al., 2007).

“Ecosistemas modelo” podem ser uma ferramenta útil para avaliar o destino e as implicações da contaminação por mercúrio em ambientes aquáticos (CORREIA et al., 2012a; TESSIER et al., 2007). Experimentos de incubação utilizando traçadores isotópicos permitem a modelagem de ambientes e de processos que ocorrem na natureza. A partir desse tipo de experimento, é possível investigar a distribuição e o comportamento do mercúrio em diferentes compartimentos ambientais através da construção de um microcosmo (CORREIA et al., 2012a; RIBEIRO GUEVARA et al.,

2008, 2007; TESSIER et al., 2007). O uso de métodos radioquímicos em sistemas modelo pode ser vantajoso por simplificar o desenho experimental, já que a determinação das concentrações iniciais de mercúrio total e do metilmercúrio em todos os compartimentos não é necessária (GUIMARÃES et al., 2000a). O ^{203}Hg é um isótopo de mercúrio emissor gama produzido artificialmente. Este radiotraçador é uma boa opção para esse tipo de estudo, já que a espectrometria gama não é destrutiva (CORREIA et al., 2012), permitindo assim sucessivas medições de espécimes *in vivo* e também medições de materiais como tubos de silicone e rolhas, nas quais a medição de Hg por métodos convencionais seria muito difícil. Além disso, amostras líquidas, como extratos de MeHg, podem ser medidas por cintilação líquida com alta eficiência de contagem (80%). Já foram realizados anteriormente experimentos de microcosmos com solo, sedimento, água de rios, macrófitas e mexilhões *Perna perna* utilizando o ^{203}Hg (CORREIA et al., 2012a, 2012b; GILMOUR; RIEDEL, 1995; GUIMARÃES et al., 2000a, 2000b; MALAGRINO, 2003).

No presente estudo, o ^{203}Hg foi utilizado para investigar a distribuição, metilação, volatilização, bioacumulação e depuração de mercúrio em sistemas modelo de laboratório com e sem a presença de *Bunodosoma caissarum*.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Amostragem e aclimação

Um total de sete espécimes de *Bunodosoma caissarum*, de mesma classe de tamanho, foi coletado na Praia de Geribá (22°46'51.40"S e 41°54'15.38"W), localizada na Armação dos Búzios, no estado do Rio de Janeiro no sudeste do Brasil. Este local está situado a aproximadamente 160 km da área urbana da cidade do Rio de Janeiro, em uma região considerada por ter menor influência antrópica quando comparada à região metropolitana. Não há muitos estudos de contaminação por metais na região. No entanto, Carvalho et al. (1991); Rezende e Lacerda (1986) e Francioni et al. (2004) observaram em estudos comparativos no litoral do Rio de Janeiro concentrações de metais baixas na biota de Arraial do Cabo (região próxima à Búzios) comparadas à outras regiões do litoral consideradas impactadas, como a Baía de Sepetiba. Os espécimes de *B. caissarum* foram cuidadosamente removidos do substrato rochoso

através de mergulho com snorkel e foram transportados ao laboratório de Traçadores W.C. Pfeiffer do Instituto de Biofísica da UFRJ em recipientes plásticos contendo água do mar local com aeração. Os organismos foram, então, aclimatados às condições de laboratório por um período de 30 dias. Cada espécime foi acondicionado em um béquer (Pyrex) de 500 ml contendo água do mar sob constante aeração, mantida a temperatura de aproximadamente 22°C, pH de 7,84 e salinidade de 33,7.

5.2.2 Incubação

O desenho experimental (Figura 36) foi adaptado de Correia et al. (2012a). Os diferentes tipos de amostras foram incubados com ^{203}Hg em béqueres de 500 mL dispostos dentro de dessecadores de borossilicato hermeticamente vedados. Os dessecadores possuíam renovação de ar contínua realizada por uma bomba de pressão negativa e as formas voláteis de Hg foram coletadas através de borbulhamento em uma solução ácida de permanganato de potássio (KMnO_4 0,125 mol L⁻¹ em 0,5% de ácido sulfúrico). Este desenho experimental permitiu a quantificação de espécies voláteis de Hg, principalmente Hg^0 e dimetilmercúrio, em cada sistema. Sete réplicas de *B. caissarum* foram acondicionadas em béqueres individuais contendo água do mar marcada com o radiotraçador ^{203}Hg e foram incubadas ao longo do experimento de incorporação de Hg por um período de 6 dias. Em seguida foi realizado um experimento de depuração de 48 dias. Como controle, foram utilizados dessecadores com o mesmo sistema citado anteriormente, com béqueres de 500 mL contendo somente água do mar marcada com ^{203}Hg (Figura 36).

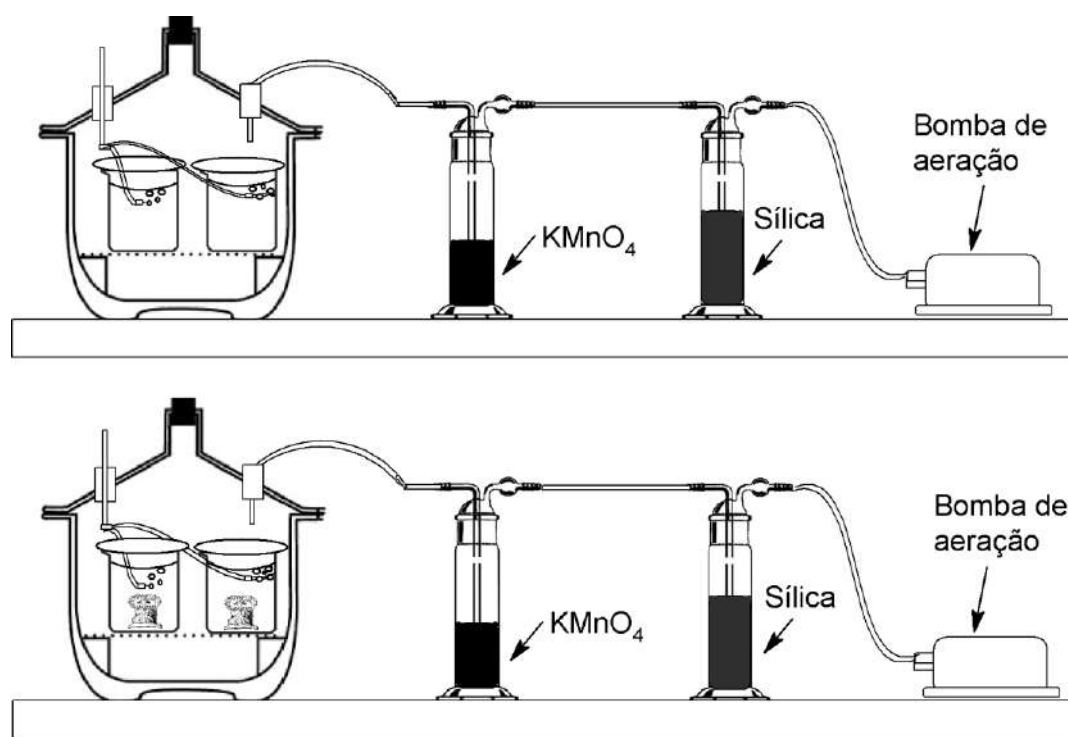


Figura 36 - Incubações contendo somente água do mar (dessecador superior) e água do mar e *B. caissarum* (dessecador inferior).

Um único *spike* inicial de ^{203}Hg inorgânico, na forma de $^{203}\text{HgCl}_2$ (Eckert and Ziegler Isotope Products Laboratories, USA), foi adicionado à coluna d'água de cada microcosmo. Nos sistemas contendo somente água do mar não-filtrada a adição de ^{203}Hg foi de aproximadamente $7,8 \times 10^5 \text{ DPM L}^{-1} - 0,351 \text{ uCi L}^{-1}$. Nos béqueres contendo água do mar não-filtrada e *B. caissarum* foi adicionado um *spike* de aproximadamente $3,8 \times 10^6 \text{ DPM L}^{-1} - 1,712 \text{ uCi L}^{-1}$. A atividade de ^{203}Hg adicionada em cada tipo de microcosmo foi diferente para garantir que o Hg seria detectável na água do mar filtrada até o fim do experimento. O Hg foi adicionado em maior concentração nos microcosmos contendo *B. caissarum* para compensar as perdas por incorporação pelos organismos. Imediatamente após a adição de ^{203}Hg , os dessecadores foram fechados e selados com graxa de silicone para gerar vácuo. A vedação foi restaurada após cada abertura dos dessecadores.

Nos experimentos de incorporação, a atividade de ^{203}Hg foi determinada periodicamente na água do mar e nos espécimes de todos os microcosmos durante 6 dias. Em seguida, os mesmos sete espécimes foram submetidos a um processo de depuração de 48 dias. Durante a depuração, a água foi renovada com água do mar

sem adição de ^{203}Hg nos dias 1, 6, 13, 21, 27, 35 e 48. A atividade de ^{203}Hg na água do mar e nos organismos foi determinada antes de cada renovação da água.

5.2.3 Análise das amostras em laboratório

A atividade de ^{203}Hg total (^{203}HgT) em DPM (desintegrações por minuto) foi determinada em cada amostra através de espectrometria gama. A maior parte das amostras foi analisada em um espectrômetro gama com trocador de amostras Perkin Elmer Wizard 2480. Espécimes de *B. caissarum* foram lavados com água do mar sem ^{203}Hg e radioanalisados *in vivo* em béqueres sem água. Os béqueres contendo *B. caissarum* foram contados no modo manual em um espectrômetro gama com trocador de amostras Perkin Elmer Wizard 1470, posicionando os espécimes no topo do detector well-type NaI(Tl) e alinhando os centros geométricos dos espécimes e do detector. Com esta geometria 2π a eficiência de contagem foi de 10%. Amostras de 2 mL de água foram contadas em tubos teste tampados no poço do detector e com esta geometria 4π a eficiência de contagem foi de 93,6%. A eficiência de contagem foi previamente determinada para as diferentes geometrias de contagem utilizando soluções padrão de ^{203}Hg , reproduzindo as condições de geometria de contagem das diferentes amostras (água e soluções de KMnO_4 em tubos teste em geometria de poço, anêmonas em béqueres de 50 ml em geometria planar, etc.). A eficiência obtida para cada geometria foi usada para converter a atividade relativa (CPM, contagens por minuto) em atividade absoluta (DPM), fazendo com que todos os dados de contagem sejam diretamente comparáveis, após correção de decaimento. As menores eficiências de contagem foram obtidas para as anêmonas em geometria planar. Entretanto, devido à sua massa e sua capacidade de acumular Hg, o ^{203}Hg foi confortavelmente detectável nas anêmonas em todas as amostragens. Todos os resultados das análises por espectrometria gama obtidos em CPM foram corrigidos para DPM levando em consideração a eficiência de contagem em cada geometria de contagem, o *background* do equipamento e o decaimento do ^{203}Hg .

O Me^{203}Hg foi extraído e medido através de um método adaptado de Guimarães et al. (2000b, 1995). Para a extração de MeHg foram adicionados às amostras 4 mL de 3 M NaBr em H_2SO_4 11% e 1 mL de CuSO_4 0,5 M. Posteriormente, as amostras foram agitadas, centrifugadas e o Me^{203}Hg presente no sobrenadante foi extraído com um coquetel de cintilação contendo tolueno e os sais de cintilação POP

(2,5-diphenyloxazole) e POPOP [1,4-bis-2-(5-phenyloxazolyl)-benzene]. Após este procedimento, os extratos orgânicos foram transferidos para frascos de cintilação e mantidos no escuro por 24 horas para eliminar a quimioluminescência antes da medida no cintilador líquido Perkin Elmer Tri-Carb 2800TR. A atividade de Me^{203}Hg foi transformada para DPM após a correção do decaimento de ^{203}Hg , do efeito de “quenching”, do “background” do equipamento e da eficiência de extração. Os resultados foram expressos como a porcentagem do total de ^{203}Hg adicionado que foi convertida em Me^{203}Hg . Esta metodologia não pode separar taxas de metilação e demetilação, portanto gera apenas uma estimativa dos potenciais líquidos de metilação.

Para avaliar a distribuição de Hg total (HgT) nos microcosmos o ^{203}Hg foi analisado em todos os compartimentos. Foi determinada a atividade de ^{203}HgT através de espectrometria gama nas amostras de água do mar, nos tecidos dos espécimes, nas secreções mucosas, nas partículas depositadas, na fração volatilizada, nos tubos de silicone de aeração e nos algodões utilizados para retirar o Hg aderido às paredes de vidro dos microcosmos. Mediu-se também o conteúdo de Me^{203}Hg na água do mar e nos tecidos dos espécimes. Detalhes das análises estão descritos nos próximos sub-itens.

5.2.4 *Bunodosoma caissarum*

Nos dias 1, 2, 4 e 6 do experimento de incorporação mediu-se o ^{203}HgT (DPM) nos sete espécimes de *B. caissarum*. Durante o processo de depuração, o HgT foi determinado nos espécimes pouco antes de cada renovação da água, o que ocorreu nos dias 1, 6, 13, 21, 27, 35 e 48.

Após os 48 dias de depuração, os sete espécimes de *B. caissarum* foram rinsado com água Milli-Q e congelados. Em seguida, as amostras foram liofilizadas e depois maceradas. Após este tratamento, o ^{203}HgT e o Me^{203}Hg foram medidos nos tecidos de cada espécime.

5.2.5 Água do mar

Na água do mar de cada microcosmo, o ^{203}HgT foi medido após a adição e também nos dias 1, 2, 4 e 6. No último dia do experimento de incorporação de Hg, o ^{203}HgT e o Me^{203}Hg foram também medidos nas frações particulada e dissolvida da água do mar em cada microcosmo. Duas amostras de 200 mL de água do mar foram retiradas de cada sistema e filtradas em membranas de éster de celulose (Millipore) de porosidade 0,22 μm .

Em cada béquer, duplicatas dos filtros e da água filtrada foram analisados por espectrometria gama para a determinação de ^{203}HgT e, então, extraídos para a quantificação de Me^{203}Hg . Durante o experimento de depuração, o ^{203}HgT na água do mar foi determinado pouco antes de cada renovação da água.

5.2.6 Volatilização

A atividade de ^{203}Hg foi medida nas soluções de KMnO_4 de cada dessecador para avaliar a volatilização de Hg. Uma solução de cloridrato de hidroxilamina 12% foi usada para dissolver os precipitados de KMnO_4 formados nas paredes dos borbulhadores. As soluções de KMnO_4 e de cloridrato de hidroxilamina foram medidas nos dias 2 e 6 do experimento de incorporação e no último dia de depuração. Assim, o total de Hg volatilizado foi calculado como a soma das atividades, corrigidas para o decaimento, das soluções de KMnO_4 e das soluções de lavagem do cloridrato de hidroxilamina.

5.2.7 Partículas depositadas, secreções mucosas, adsorção às paredes dos microcosmos, graxa de silicone e tubos de silicone de aeração

A secreção mucosa dos espécimes de *B. caissarum*, as partículas depositadas, os tubos de silicone para aeração, as paredes de vidro dos microcosmos (béqueres, vidros de relógio e dessecadores) e as graxas de silicone dos dessecadores de cada tratamento foram analisados por espectrometria gama no último dia de incubação. Algodões embebidos em solução ácida de KMnO_4 foram utilizados para remover o ^{203}Hg adsorvido às paredes de vidro dos dessecadores, dos

béqueres e dos vidros de relógio. Por fim, a graxa de silicone usada para vedar os dessecadores foi removida com uma espátula e analisada por espectrometria gama.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ^{203}Hg adicionado durante a incubação foi detectado em todos os compartimentos dos microcosmos. Dados das atividades de ^{203}HgT e Me^{203}Hg na água do mar e em *B. caissarum* e da distribuição de ^{203}HgT em cada um dos compartimentos dos microcosmos estão indicados abaixo (Figuras 7, 8 e 9).

5.3.1 Atividade de ^{203}HgT em *B. caissarum* e na água do mar

Todos os espécimes de *B. caissarum* foram capazes de bioacumular Hg a partir do *spike* inicial de ^{203}Hg (Figura 37a). Ao final do experimento de incorporação, o ^{203}Hg na água do mar decresceu para 0,5 a 1,3% de sua atividade inicial nos microcosmos com *B. caissarum* e para 1,6 a 2,1% nos microcosmos sem *B. caissarum*. Os espécimes apresentaram uma média do fator de bioconcentração (FBC) de 70; este fator foi calculado como $[\text{HgT}] \text{ } B. \text{ caissarum} \text{ (dpm g}^{-1} \text{ peso úmido)}/[\text{HgT}] \text{ água do mar filtrada (filtro } 0,22 \text{ }\mu\text{m) (dpm mL}^{-1}\text{)}$. Em um experimento similar de incubação de *P. perna* por 10 dias com ^{203}Hg , porém com concentrações de exposição mais de 24 vezes superiores ($42\text{-}97 \text{ uCi L}^{-1} \sim 1,11 \text{ mg L}^{-1}$), Malagrino (2003) encontrou FBCs de $27,2 \pm 32,1$. Os FBC de Hg para *P. perna* encontrados foram menores que os encontrados para *B. caissarum* no presente estudo. Se as concentrações de exposição utilizadas por Malagrino (2003) tivessem sido menores possivelmente *P. perna* teria apresentado maiores FBCs. Em um experimento de incubação de 6 dias com mexilhões *Perna viridis* em água do mar com adição de um *spike* de HgCl_2 , os FBCs variaram de 126 a 404, dependendo das concentrações de Hg adicionadas (LAKSHMANAN; NAMBISAN, 1989).

Após o período de 48 dias de depuração, os espécimes de *B. caissarum* ainda retiveram de 35 a 70% do HgT bioacumulado durante o experimento de incorporação (Figura 37b). No experimento acima citado de incubação por 6 dias com *Perna viridis*,

estes mexilhões foram expostos a um meio sem adição de Hg por 20 dias e mantiveram 76,7% do Hg acumulado (LAKSHMANAN; NAMBISAN, 1989).

Comparando o presente estudo com o de Anandraj et al. (2002), *B. caissarum* e *Perna perna* apresentaram diferentes padrões de depuração. Enquanto *B. caissarum* depurou o Hg a uma taxa relativamente constante (Figura 37b), *P. perna* apresentou uma rápida depuração nos primeiros dias e reteve apenas 15% do Hg acumulado (ANANDRAJ et al., 2002). Os autores concluíram que esta rápida perda de Hg dos tecidos pode limitar o uso de *P. perna* para o biomonitoramento em, por exemplo, situações de fontes variáveis de poluição, como emissários submarinos. *B. caissarum* manteve uma alta porcentagem do Hg bioacumulado após longo período de depuração. Assim, esta espécie poderia ser indicada para o biomonitoramento de locais com concentrações variáveis de Hg e também para avaliar impactos agudos. Nestas circunstâncias de flutuações das concentrações de Hg no ambiente seria interessante o uso complementar das duas espécies, *B. caissarum* e *P. perna*, pois em eventos agudos, provavelmente *P. perna* incorporaria o Hg em seus tecidos mais rapidamente que *B. caissarum*, porém depuraria também mais rápido este metal e em eventos crônicos ambas as espécies demonstrariam a presença do Hg. Cada espécie responde às flutuações das concentrações no ambiente de forma diferente. Assim, o uso destas duas espécies tornaria o estudo de monitoramento da contaminação por Hg mais robusto.

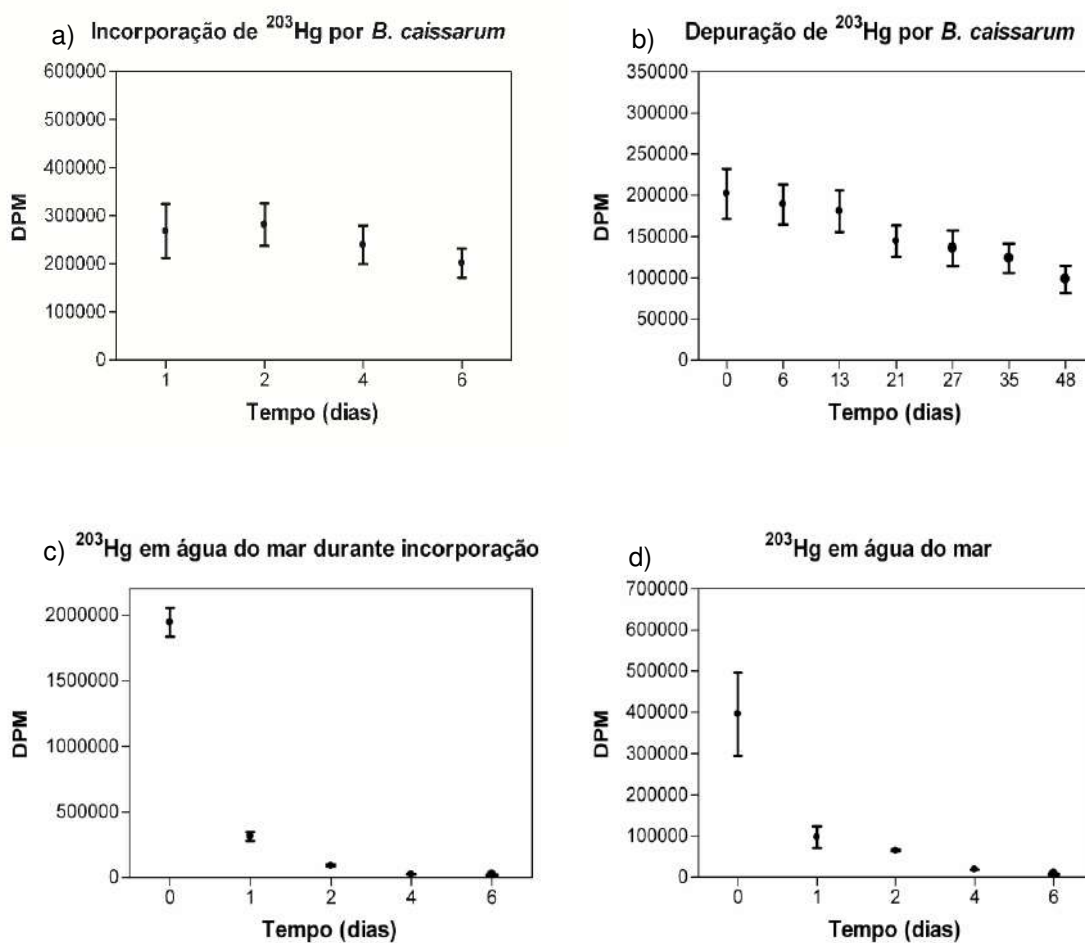


Figura 37 - Atividade de ^{203}Hg em *B. caissarum* durante incorporação (a), depuração (b) e na água do mar dos microcosmos com (c) e sem *B. caissarum* (d).

5.3.2 Distribuição de mercúrio total

A distribuição de ^{203}HgT entre os diferentes compartimentos dos microcosmos está representada na Figura 38. O ^{203}Hg adicionado no início do experimento não foi totalmente recuperado. Nos tratamentos com *B. caissarum*, 88% do *spike* inicial de ^{203}Hg foi recuperado. Já nos tratamentos sem *B. caissarum* a recuperação foi de 80%. Isto pode ter ocorrido devido à uma extração incompleta do Hg adsorvido às superfícies de vidro dos microcosmos e/ou pela perda de material particulado aderido aos espécimes quando estes eram lavados com água do mar não-marcada anteriormente às medições.

Em ambos os tipos de microcosmos o Hg estava presente em todos os compartimentos testados. Nos tratamentos contendo *B. caissarum*, a maior quantidade de Hg correspondeu a fração volatilizada. Já nas incubações sem *B.*

caissarum, as mangueiras de silicone, as paredes dos béqueres e a fração volatilizada foram os compartimentos com as maiores porcentagens de Hg (Figura 38).

A volatilização total de Hg nos tratamentos contendo somente água do mar foi de aproximadamente 17% do ^{203}Hg adicionado. Já a volatilização total de Hg nos sistemas contendo água do mar e *B. caissarum* foi de 58%, mais de três vezes maior que o controle (Figura 38). Este resultado não era esperado, já que a incorporação de Hg por *B. caissarum* e a complexação com os subprodutos de seu metabolismo reduziriam a disponibilidade de Hg para a redução e conseqüente volatilização. No entanto, a presença de matéria orgânica lábil, como as secreções mucosas presentes nos microcosmos com *B. caissarum*, pode ter aumentado a atividade bacteriana, contribuindo para uma maior volatilização.

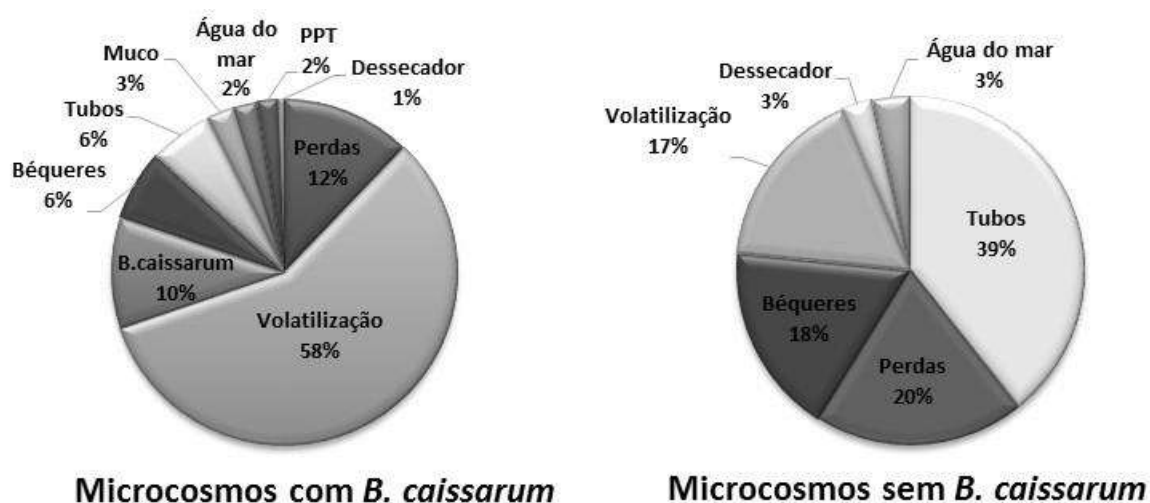


Figura 38 - Distribuição de HgT (%) em diferentes compartimentos dos microcosmos com e sem *B. caissarum*.

Os microrganismos desempenham um papel importante na ciclagem do mercúrio em ecossistemas aquáticos (DRISCOLL et al., 2012; ULLRICH et al., 2001). Estes podem catalisar muitas inter-conversões entre as diferentes formas do Hg, como redução e metilação (CORREIA et al., 2012b; MASON et al., 2012; ULLRICH et al., 2001). A redução do Hg^{2+} também pode ser causada por reações fotoquímicas envolvendo substâncias húmicas (ALLARD; ARSENIE, 1991; LANZILLOTTA et al., 2002). Este experimento não permite distinguir entre o Hg inorgânico (Hg^0) e o dimetilmercúrio na fração volátil. No entanto, o Hg^0 é a forma predominante de Hg

dissolvido gasoso em ecossistemas marinhos e a sua transferência para a atmosfera acontece devido à sua baixa solubilidade em água e alta volatilidade (MASON et al., 1995; SOERENSEN et al., 2010). Correia et al. (2012a) realizaram um experimento de incubação de macrófitas de água doce com adição de ^{203}Hg . Os autores observaram uma volatilização do ^{203}Hg de 0,48% e 5,26% nos microcosmos com e sem macrófitas respectivamente. Embora a volatilização não tenha sido muito alta nos sistemas com macrófitas, os resultados sugerem que a redução do Hg^{2+} foi mediada principalmente por microrganismos associados à sua raiz. Por outro lado, Battke et al. (2008) detectaram a fito-redução do Hg^{2+} para Hg^0 pelo ácido ascórbico endógeno de diferentes espécies de árvores e plantas em níveis muito mais elevados do que os dos controles. Estas espécies foram transplantadas para sistemas hidropônicos e cultivadas em um meio de HgCl_2 e a redução bacteriana foi descartada. Foi concluído neste estudo que a redução do Hg ocorre juntamente com os processos de defesa antioxidante destas espécies e que este é um mecanismo importante de detoxificação. No presente trabalho, para compreender melhor a volatilização nos microcosmos com *B. caissarum*, mais estudos são necessários. Porém, já que nos microcosmos com *B. caissarum* a volatilização de Hg foi três vezes maior que nos controles, ambos com condições fotoquímicas similares, a redução de Hg^{2+} adicional foi provavelmente mediada por microrganismos.

5.3.3 MeHg na água do mar e em *B. caissarum*

Em ambos os tratamentos, a formação de Me^{203}Hg foi observada (Figura 39). Após o experimento de incorporação, o MeHg foi quantificado na água do mar de todos os microcosmos. Na água do mar dos microcosmos contendo *B. caissarum*, do total de Hg na fração dissolvida, 4,4 a 8,4% estava presente na forma de MeHg. Nestes microcosmos, o MeHg na fração particulada variou de 0,1 a 2,7% do total de Hg particulado. Na água do mar dos microcosmos sem *B. caissarum*, o MeHg na fração dissolvida correspondeu a 31,3 a 39,4% do total de Hg nesta fração. Do total de Hg na fração particulada, 8,3 a 9,5% eram MeHg. Associando-se o MeHg na água do mar (após o experimento de incorporação) e nos tecidos dos espécimes (medidos após a depuração), o total de MeHg nos microcosmos com *B. caissarum* correspondeu a 0,05% do ^{203}Hg adicionado. Nos microcosmos sem *B. caissarum*, 0,32% do *spike*

inicial de ^{203}Hg na água do mar foi convertido a MeHg. Desta forma, houve maiores níveis de Me^{203}Hg total nos microcosmos sem *B. caissarum*. Em um experimento de incubação, com sedimento, água doce, algas e caramujos, Tessier et al. (2007) também registraram concentrações de MeHg mais elevadas na coluna d'água dos microcosmos controle. Os mesmos autores observaram um maior conteúdo de Hg inorgânico na água disponível para metilação nos sistemas controle, quando comparados com os tratamentos, sugerindo ser este um possível motivo para as maiores concentrações de MeHg encontradas nos controles. De acordo com os autores, sob as condições experimentais destes sistemas, os microrganismos presentes puderam se desenvolver e contribuir para a produção e acumulação de MeHg na coluna d'água sem uma bioacumulação competitiva de macro-invertebrados. Esta é uma explicação possível para os níveis mais baixos de MeHg medidos nos microcosmos que continham *B. caissarum* na presente pesquisa, uma vez que o HgT disponível para a metilação era inferior ao dos microcosmos controle. As porcentagens de HgT do *spike* inicial na água do mar dos microcosmos com *B. caissarum* nos dias 1, 2, 4 e 6 foram respectivamente 16,1, 4,6, 1,2 e 0,9% e nos controles os níveis foram respectivamente 24,7, 16,4, 4,7 e 1,8% (Figura 39). Ainda, ao final do experimento de incorporação, verificou-se maiores concentrações de material particulado em suspensão (MPS) em microcosmos com *B. caissarum* (103 mg L^{-1}) do que nos controles ($9,4 \text{ mg L}^{-1}$). Por este motivo, seria mais esperado que os íons de Hg formassem complexos com o MPS mais facilmente em microcosmos com *B. caissarum*. Portanto, o Hg estaria menos disponível para metilação do que nos controles.

Uma desvantagem do desenho experimental utilizado no presente estudo é que, devido à natureza destrutiva da extração de MeHg e aos volumes necessários para a sua quantificação na água, este somente pode ser medido na água do mar ou em espécimes ao final da incubação. Isto não permite uma estimativa de quanto MeHg foi demetilado durante as incubações ou acompanhar ao longo do tempo a formação de MeHg.

Após o processo de depuração, o MeHg foi determinado nos tecidos dos espécimes de *B. caissarum*. Do total de ^{203}Hg contido nos seus tecidos, de 0,2 a 2,4% estavam na forma de Me^{203}Hg (Figura 39). O MeHg nos tecidos dos espécimes não foi medido após o experimento de incorporação, para que pudessem ser preservados

para os subseqüentes experimentos de depuração, o que pode ter permitido alguma demetilação de Me^{203}Hg nos tecidos não medidos. Por outro lado, o Me^{203}Hg não foi medido nas secreções mucosas dos espécimes. Por estes motivos, a formação total de MeHg nos microcosmos contendo *B. caissarum* provavelmente foi subestimada. Com este desenho experimental, não foi possível estabelecer quanto do Me^{203}Hg em *B. caissarum* foi formado nos próprios espécimes e quanto foi formado na água do mar ou nas secreções mucosas e então acumulados por *B. caissarum*.

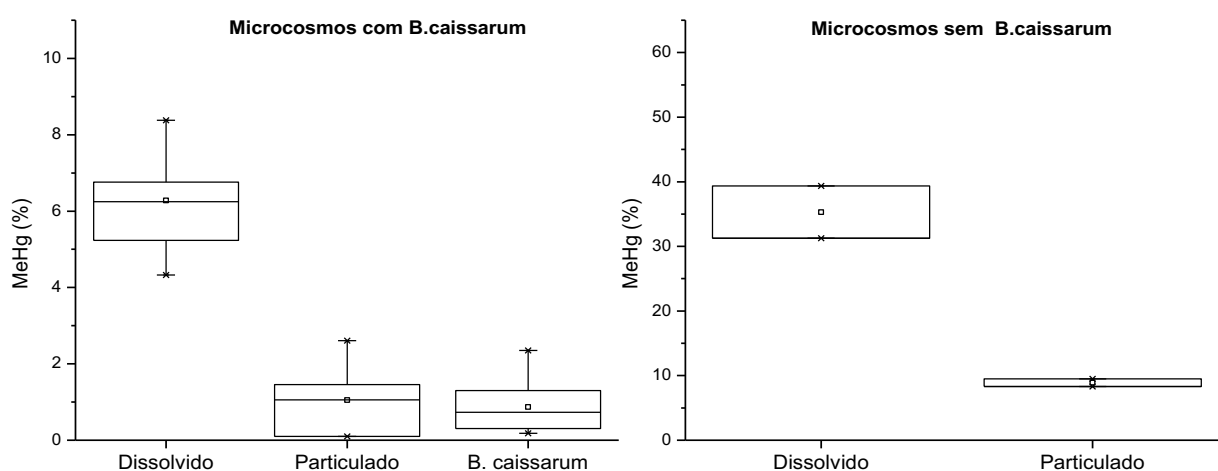


Figura 39 - Média de Distribuição de HgT (%) em diferentes compartimentos dos microcosmos com e sem *B. caissarum*.

Este experimento demonstrou a formação de Me^{203}Hg na água do mar dos microcosmos sem *B. caissarum*. Diversos autores observaram a produção de MeHg na coluna d'água de sistemas de água doce (RIBEIRO GUEVARA et al., 2008, 2007; TESSIER et al., 2007), apesar da metilação de Hg ocorrer predominantemente em sedimentos (TESSIER et al., 2007), perifíton (CORREIA et al., 2012b; MAURO et al., 2002) e epilíton (DESROSIERS et al., 2006). Koron et al. (2012) detectou a produção de Me^{197}Hg na água do mar de experimentos de incubação com o radiotraçador ^{197}Hg em diferentes períodos de incubação. No entanto, geralmente é assumido que em ambientes marinhos a produção de MeHg ocorre principalmente nos sedimentos (MERRITT; AMIRBAHMAN, 2009). As substâncias presentes na água, como material húmico, algal, secreções de microrganismos e íons cloreto podem ter uma grande influência sobre a metilação de Hg na coluna d'água (SICILIANO et al., 2005; WEBER, 1993). A presença de carbono orgânico dissolvido (COD) na água, independente da quantidade, pode gerar um aumento da metilação de mercúrio (BABIARZ et al., 2003;

RIBEIRO GUEVARA et al., 2008). A degradação bacteriana do COD pode aumentar a disponibilidade de grupos metil, e assim aumentar a produção de MeHg (RIBEIRO GUEVARA et al., 2008). Estudos do ambiente marinho sugerem que há uma relação linear entre a metilação de Hg e as taxas de decomposição da matéria orgânica na coluna d'água (COSSA et al., 2011; HEIMBURGER et al., 2010). Diversos microrganismos podem influenciar na metilação de Hg inorgânico, como as bactérias sulfato-redutoras e as metanogênicas (CORREIA et al., 2012b; HAMELIN et al., 2011; RIBEIRO GUEVARA et al., 2008; ULLRICH et al., 2001). A metilação mediada por microrganismos tende a ser mais eficiente dependendo da atividade e da estrutura da comunidade bacteriana, da disponibilidade de Hg e de nutrientes e da abundância de aceptores de elétrons (CHOI; BARTHA, 1994; MACALADY et al., 2000; TESSIER et al., 2007). Heimbürger et al. (2010); Malcolm et al. (2010) e Mason et al. (2012) reportaram que os principais organismos metiladores em ambientes costeiros e de água doce são as bactérias anaeróbicas. No entanto, na coluna d'água de ambientes marinhos se avalia que estas bactérias possuem um papel menos importante, no qual a metilação parece estar mais ligada à decomposição de carbono orgânico que ocorre nas águas oceânicas superficiais. A metilação de Hg não ocorre somente em ambientes com deficiência de oxigênio, como nos sedimentos marinhos (DURAN et al., 2008; HOLLWEG et al., 2009) ou em biofilmes de comunidades estuarinas (HUGUET et al., 2010). Há evidências de que a metilação de Hg ocorre em água do mar óxica onde as bactérias decompõem (rem mineralização) o fluxo de matéria orgânica particulada em decantação na coluna d'água (CONAWAY et al., 2009; COSSA et al., 2009, 2011; HAMMERSCHMIDT; BOWMAN, 2012; LEHNHERR et al., 2011; MONPERRUS et al., 2007; SUNDERLAND et al., 2009). A produção de MeHg na água do mar óxica não está totalmente elucidada. Esta pode ocorrer devido à metilação abiótica (CELO et al., 2006) ou o MeHg pode ser produzido *in situ* através atividade microbiana aeróbica (MONPERRUS et al., 2007) ou então a produção de MeHg pode ser mediada por microrganismos anaeróbicos associados a microambientes anóxicos, como por exemplo, restos de plâncton em decomposição (HEIMBÜRGER et al., 2010). O papel dos microrganismos na metilação de Hg na água do mar é ainda uma área a ser melhor explorada. No entanto, os resultados do presente estudo sugerem que mesmo em condições de baixos níveis de COD este processo pode ser importante.

6 BIOACUMULAÇÃO DE CÁDMIO POR *B. CAISSARUM* E *P. PERNA* E ESTUDOS DE ESPECIAÇÃO DE CÁDMIO NESTAS ESPÉCIES

6.1 INTRODUÇÃO

O cádmio (Cd) é um metal tóxico geralmente presente em baixas concentrações no meio ambiente. Entretanto, atividades industriais e agrícolas são apontadas como responsáveis pelo aumento de seus níveis (WHO, 1992, 2010). Algumas fontes antrópicas de Cd que chegam aos ambientes aquáticos através do escoamento ou da deposição atmosférica são resíduos da mineração, da fundição e refinamento de metais não ferrosos, da queima de combustíveis fósseis, de materiais elétricos e eletrônicos e fertilizantes. De acordo com WHO (2010), os mais altos níveis de Cd em alimentos podem ser encontrados em algumas espécies de mamíferos, ostras, vieiras, mexilhões e crustáceos. A exposição crônica de seres humanos ao Cd pode causar danos aos ossos, pulmões e rins. Este metal traço tem a capacidade de interferir na homeostase de cálcio nas células (BIAGIOLI et al., 2008).

O uso de Cd isotopicamente enriquecido como traçador em experimentos de exposição *in vivo* permite distinguir entre as fontes de Cd endógenas e exógenas por meio do monitoramento das razões isotópicas através do uso da análise de diluição isotópica (ID) (RODRÍGUEZ-CEA et al., 2006). Além disso, o uso de uma abordagem de *Isotope Pattern Deconvolution* (IPD) pode simplificar os cálculos de concentrações em amostras que contêm espécies endógenas e espécies enriquecidas (GARCIA ALONSO; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, 2013). O estudo de microcosmos acoplados ao uso de traçadores isotópicos e à análise de especiação oferecem um grande potencial para a investigação de processos ambientais dinâmicos (RODRÍGUEZ-CEA et al., 2006).

Nem todas as funções das metalotioneínas (MTs) estão totalmente elucidadas. No entanto, é reconhecido que as proteínas citosólicas estão envolvidas na homeostase de metais essenciais, como o zinco, e na detoxificação de metais tóxicos, como o cádmio e o mercúrio (AMIARD et al., 2006; GEFFARD et al., 2005; LAVILLA et al., 2012; NG et al., 2007). Um aumento na expressão de MTs em resposta à elevação de concentrações de Cd foi demonstrada em diversos organismos marinhos, como bivalves e gastrópodes (AMIARD et al., 2006; NG et al., 2007; BLACKMORE; WANG, 2004). Além das MTs, outras proteínas citosólicas, como as

proteínas de alto peso molecular (PAPMs) e proteínas de baixo peso molecular (PBPMs), também podem estar associadas a metais. Em experimentos com mexilhões *P. viridis* expostos ao Cd, tanto as PSMTs (proteínas similares às metalotioneínas) quanto as PAPMs se mostraram importantes ligantes de Cd quando houve um aumento nas concentrações deste metal (NG et al., 2007). A maioria dos estudos com MTs são em bivalves, no entanto outros organismos, como as esponjas, apresentaram PSMTs (BERTHET et al., 2005).

No presente estudo, utilizou-se ^{116}Cd enriquecido para investigar a incorporação e o comportamento de cádmio em sistemas modelo de laboratório com *Bunodosoma caissarum* ou *Perna perna*, para compreender a especiação de Cd nos tecidos dos organismos e também tentar identificar proteínas que se associam ao Cd nos tecidos de organismos destas espécies.

6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

6.2.1 Amostragem e aclimação

Um total de 14 espécimes de *Bunodosoma caissarum* e 21 espécimes de *Perna perna* foram simultaneamente coletados em Arraial do Cabo (Ilha de Cabo Frio) (22° 59' 25" S e 41° 59' 25" W), no estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil. Este local está situado a aproximadamente 160 km da área urbana da cidade do Rio de Janeiro, em uma região considerada por ter menor influência antrópica quando comparada à região metropolitana. Carvalho et al. (1991); Rezende e Lacerda (1986) e Francioni et al. (2004) em estudos comparativos no litoral do Rio de Janeiro observaram concentrações de metais baixas na biota de Arraial do Cabo comparadas à outras regiões do litoral consideradas impactadas, como a Baía de Sepetiba. A coleta dos espécimes ocorreu em fevereiro de 2013 e foi realizada através de mergulho com snorkel. Os espécimes foram cuidadosamente removidos do substrato rochoso e transportados ao laboratório de ecotoxicologia marinha da Faculdade de Oceanografia (FAOC) da UERJ em recipientes plásticos contendo água do mar local com aeração. Os organismos foram então aclimatados às condições do laboratório em aquários de 10 L contendo água do mar. Os espécimes de *B. caissarum* e de *P. perna* eram de mesma classe de tamanho, com respectivamente 2,5-3,5 cm de diâmetro e 6-7 cm de comprimento de concha.

Em cada aquário havia sete espécimes de *B. caissarum* ou sete espécimes de *P. perna* (Figuras 40 e 41). A água do mar de cada aquário esteve sob constante aeração e mantida a aproximadamente 20°C, pH de 8,25 e salinidade de 34,4.



Figura 40 - Incubações em aquários contendo água do mar e água do mar e *B. caissarum*.



Figura 41 - Incubações em aquários contendo água do mar e água do mar e *P. perna*.

6.2.2 Incubação com ^{116}Cd

O desenho experimental (Figuras 40 e 41) dos microcosmos consistiu em cinco aquários de 10 L. Foram três tipos de tratamento. O primeiro, denominado To, era o controle e consistia em um aquário contendo água do mar e sete espécimes de *B. caissarum* (chamado ToA) e um outro aquário com água do mar e sete espécimes de *P. perna* (chamado ToM). Neste tratamento, não houve adição de Cd. O segundo

tipo de tratamento, chamado T1, consistia em um aquário contendo água do mar e sete espécimes de *B. caissarum* (T1ACd) e outro aquário com água do mar e sete espécimes de *P. perna* (T1MCd). Em cada um destes aquários um *spike* enriquecido em ^{116}Cd ($^{116}\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, Merck, Alemanha) foi adicionado à coluna d'água de modo a se alcançar uma concentração de aproximadamente $0,9 \mu\text{g L}^{-1}$ de ^{116}Cd na água do mar. O tratamento designado T2, consistia em apenas um aquário contendo sete espécimes de *P. perna* e água do mar (T2MCd). Neste tratamento, o mesmo *spike* enriquecido em ^{116}Cd foi adicionado ao aquário de modo a se obter uma concentração de aproximadamente $4,5 \mu\text{g L}^{-1}$ de ^{116}Cd na água do mar. As concentrações de ^{116}Cd utilizadas no experimento foram escolhidas por serem próximas às encontradas em ambientes marinhos (DONAT; BRULAND, 1995). Os aquários foram mantidos sob constante aeração. As incubações duraram 12 dias com renovação de água do mar sem ^{116}Cd e novas adições do *spike* enriquecido em ^{116}Cd nos dias 1, 4, 7 e 10. Estas trocas periódicas de água (no quarto, sétimo e décimo dias) foram realizadas para que os espécimes de *P. perna* sobrevivessem em aquários. Isto porque, como observado em um experimento preliminar a este, com a função de testar a resistência destas espécies às condições de aquários, *P. perna* não sobrevive se não houver renovação periódica de água e baixas temperaturas. Além disso, a renovação de água também possui a função de alimentação, pois a água do mar natural contém diversos microrganismos como, por exemplo, plâncton. Já *B. caissarum* apresentou grande resistência à vida em aquários sem renovação de água. No entanto, ambas as espécies receberam o mesmo tratamento para fins de comparação dos resultados obtidos para cada espécie. Desta forma, a água do mar dos aquários foi renovada nos dias 4, 7 e 10 e houve adição do *spike* novamente para que as concentrações de Cd se mantivessem próximas às concentrações adicionadas no primeiro dia ao longo do experimento. A solução do *spike* de Cd adicionado à água do mar dos aquários possuía uma concentração de 200 mg L^{-1} e era enriquecida com o isótopo ^{116}Cd . As abundâncias isotópicas do *spike* de Cd determinadas foram de 89,9% de ^{116}Cd , 5,23% de ^{114}Cd , 1,04% de ^{113}Cd , 2,44% de ^{112}Cd , 0,76% de ^{111}Cd , 0,57% de ^{110}Cd , 0,03% de ^{108}Cd e 0,03% de ^{106}Cd . O *spike* enriquecido em ^{116}Cd adicionado à água do mar resultou em concentrações similares às encontradas em ambientes marinhos (DONAT; BRULAND, 1995). A abundância natural de ^{116}Cd é de 7,49% (Merck (PSE) - <http://pse.merck.de/merck.php>).

Amostrou-se 15 mL da água do mar de cada microcosmo nos dias 1, 2, 3, 4, 7, 10 e 13. Nos dias 4, 7 e 10 a amostragem de água do mar ocorreu pouco antes de cada renovação de água e imediatamente após a nova adição de Cd. Todas as amostras de água do mar foram filtradas utilizando-se filtros 0,45 µm de éster de celulose (Millipore) e foram armazenadas congeladas até o momento da análise. No dia 13, após o experimento de 12 dias, os espécimes de *B. caissarum* e *P. perna* foram lavados com água Milli-Q, armazenados separadamente em sacos plásticos vedados e, então, congelados. Os espécimes de *B. caissarum* expeliram secreção mucosa e amostras desta também foram coletadas para análise. Subsequentemente, as amostras foram liofilizadas para posterior análise. Detalhes sobre as análises estão descritos nas seções a seguir.

6.2.3 Extração dos tecidos de *B. caissarum* e *P. perna* para a determinação de ¹¹⁶Cd total

As amostras liofilizadas de *B. caissarum* e *P. perna* foram maceradas e, em seguida, 50 mg de cada amostra foram pesadas em tubos de microondas de teflon. 6 mL de ácido nítrico concentrado (65%) e 3 mL de peróxido de hidrogênio (30%) foram adicionados em cada tubo de microondas e as amostras foram digeridas em um microondas Milestone Ethos 1 (Sorisole, Itália) atingindo uma temperatura de 180°C. Os brancos foram preparados do mesmo modo, sem as amostras. Os materiais de referência NIST 1566b (tecido de ostra) e BCR 278R (tecido de mexilhão) foram digeridos da mesma maneira que as amostras para validar as análises. Todas as análises das amostras provenientes do experimento de incubação com ¹¹⁶Cd foram realizadas no Departamento de Química Física y Analítica da Universidad de Oviedo (Espanha).

6.2.4 Extração de proteínas dos tecidos de *B. caissarum* e *P. perna*

Os materiais de referência NIST 1566b (tecido de ostra) e BCR 278R (tecido de mexilhão) foram utilizados para testar doze tipos de soluções para a extração de proteínas citosólicas associadas ao cádmio. Os procedimentos de extração foram adaptados de Lavilla et al. (2012), Kutscher et al. (2012) e Mounicou et al. (2002). Para

estes testes, aproximadamente 100 mg dos materiais de referência foram pesados em tubos de centrífuga de 50 mL. 10 mL de cada solução de extração testada foram adicionados a diferentes tubos de centrífuga contendo os materiais de referência. As condições de extração foram as seguintes (Tabela 8):

Tabela 8 - Descrição dos procedimentos de extração testados

Método	Solução de extração	Tempo	Temperatura	Agitação
A	Acetato de amônio 10 mM, PMSF 0,01 mM	4h	20°C	Agitador magnético
B	Acetato de amônio 10 mM, PMSF 0,01 mM,	4h	37°C	Agitador magnético
C	Acetato de amônio 10 mM, PMSF 0,01 mM	4h	Aprox. 38°C	Ultrasom
D	Acetato de amônio 10 mM, PMSF 0,01 mM, 2-ME 5 mM	4h	20°C	Agitador magnético
E	Acetato de amônio 10 mM, PMSF 0,01 mM, 2-ME 5 mM	4h	37°C	Agitador magnético
F	Tris-HCl (tampão) 10 mM pH 7,4, PMSF 0,01 mM	4h	20°C	Agitador magnético
G	Tris-HCl (tampão) 10 mM pH 7,4, PMSF 0,01 mM	4h	37°C	Agitador magnético
H	Tris-HCl (tampão) 10 mM pH 7,4, PMSF 0,01 mM, 2-ME 5 mM	4h	20°C	Agitador magnético
I	Tris-HCl (tampão) 10 mM pH 7,4, PMSF 0,01 mM, 2-ME 5 mM	4h	37°C	Agitador magnético
J	Tris-HCl (tampão) 10 mM pH 7,4, NaCl 25 mM, PMSF 0,01 mM, 2-ME 5 mM	4h	37°C	Agitador magnético
K	Tris-HCl (tampão) 10 mM pH 7,4, NaCl 25 mM, PMSF 0,01 mM, 2-ME 5 mM	4h	Aprox. 38°C	Ultrasom

Os reagentes utilizados para as soluções de extração foram acetato de amônio (Sigma-Aldrich), phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) (Merck), Tris(2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol) (Tris) (Sigma-Aldrich), cloreto de sódio (NaCl) e 2-mercaptoethanol (2-ME) (Sigma-Aldrich).

Após a extração, as suspensões foram centrifugadas por 10 minutos a 7500 rpm. Com a finalidade de separar as frações solúvel e insolúvel o sobrenadante foi filtrado através de filtros de 0,45 µm membranas (MS® PTFE syringe filters, Membrane Solutions, USA). Os brancos foram tratados do mesmo modo. Para o estudo de recuperação de Cd nestes extratos adicionou-se *spike* enriquecido em ¹¹⁶Cd a uma alíquota de 5 mL do sobrenadante de cada extrato e estas soluções foram avolumadas com ácido nítrico concentrado (Merck suprapur) a uma concentração final de 2% (v/v).

A recuperação do total de Cd presente no material certificado após os procedimentos de extração foi determinada por diluição isotópica (ID) utilizando-se o ICP-MS (Thermo XSeries^{II} ICP-MS (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany)).

6.2.5 Análise de diluição isotópica

Para a determinação da concentração de Cd nas amostras utilizou-se as técnicas analíticas de diluição isotópica (ID) e de deconvolução de padrões isotópicos (IPD) que serão brevemente expostas a seguir.

A técnica de ICP-MS é muito eficiente para a determinação de elementos em nível traço e para análises isotópicas. A sua alta sensibilidade associada à sua capacidade multielementar possibilita um alto desempenho das análises realizadas (CADORE et al., 2008). A diluição isotópica (*Isotope Dilution* (ID)) é uma técnica analítica baseada na modificação da composição isotópica do elemento ou composto que será determinado na amostra pela adição da forma isotopicamente enriquecida ou marcada deste elemento ou composto. Este método é baseado em razões isotópicas. A espectrometria de massas com diluição isotópica (*Isotope Dilution Mass Spectrometry* (IDMS)) é considerada um método primário, desta forma é uma das técnicas utilizadas para a certificação de materiais de referencia. De acordo com a equação 1 (Equação de ID) pode-se observar que não são necessários parâmetros relacionados à sensibilidade do instrumento para a quantificação. Desta forma, alguma mudança na sensibilidade do instrumento devido a desvios de sinal (*drift*) ou interferências da matriz não causará efeito no resultado final. Esta é uma grande vantagem desta técnica em relação às outras estratégias de determinação que utilizam um gráfico de calibração (GARCIA ALONSO; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, 2013). Os cálculos de ID encontram-se abaixo resumidos na equação 1, considerando “C” como concentração, “A” como abundância isotópica, “W” como peso atômico do elemento, “s” para amostra, “t” para traçador ou *spike* (“a” é o traçador presente na amostra e “b” é o traçador adicionado para quantificação), “m” é a mistura de amostra e *spike*, “ m_t ” é a massa do *spike*, “ m_s ” é a massa da amostra, “ R_m ” é a razão da abundância isotópica na mistura “ A_m^a/A_m^b ”, “ R_s ” é a razão da abundância isotópica na amostra “ A_s^b/A_s^a ” e “ R_t ” é a razão da abundância isotópica no *spike* “ A_t^a/A_t^b ” (adaptado de GARCIA ALONSO; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, 2013).

Equação (1)
$$C_s = C_t \cdot \frac{m_t}{m_s} \cdot \frac{W_s}{W_t} \cdot \frac{A_t^b}{A_s^a} \cdot \left(\frac{R_m - R_t}{1 - R_m \cdot R_s} \right)$$

Os procedimentos para a realização da IDMS requerem a medição das abundâncias isotópicas ou razões isotópicas após a mistura de massas conhecidas da amostra e do *spike*. Assim, para a realização das medidas somente são necessários uma balança e um espectrômetro de massas calibrados. Uma vantagem da diluição isotópica IDMS é que depois que a diluição isotópica é realizada qualquer perda de parte do analito não afeta o resultado. Isto porque a razão isotópica permanece inalterada (GARCIA ALONSO; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, 2013; HEUMANN, 1992). Entretanto, alguns padrões de íons isotópicos metálicos são relativamente caros. Desta forma, deve-se avaliar qual é o melhor método a ser utilizado para cada tipo de experimento ou análise quanto à precisão, aos limites de detecção, à rapidez da análise, à possíveis interferências da matriz e ao custo, para se decidir qual a técnica ideal para a necessidade do usuário (CADORE et al., 2008).

O método de quantificação por IDMS é muito sensível e livre de interferências na análise de elementos metálicos em águas naturais em níveis de sub-ppb (PARK; YIM, 1999; YANG et al., 2004). O uso de Cd (ou outro elemento) isotopicamente enriquecido como traçador em experimentos de exposição *in vivo* é muito útil, pois permite distinguir entre as fontes de Cd (ou outro elemento) endógenas e exógenas por meio do monitoramento das razões isotópicas através do uso de IDMS (RODRÍGUEZ-CEA et al., 2006).

6.2.5.1 Isotope pattern deconvolution (IPD)

A deconvolução de padrões (ou perfis) isotópicos (*Isotope Pattern Deconvolution* (IPD)) é uma recente técnica matemática na qual o balanço de quantidades é estabelecido em função dos diferentes perfis isotópicos das espécies endógenas e enriquecidas encontradas em uma amostra após inter-conversões. Esta abordagem de ID, baseada em uma notação de matricial, utiliza um sistema matemático de equações obtidas deste balanço de quantidades e regressão linear

múltipla, na qual aplica-se um ajuste dos mínimos quadrados para calcular os valores das frações molares correspondentes (GARCIA ALONSO; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, 2013). O uso de IPD foi proposto primeiramente para simplificar os cálculos dos resultados da diluição isotópica de duplo *spike* (*double spiking species-specific isotope dilution*) quando inter-conversões podem ocorrer (MEIJA et al., 2006). Esta abordagem IPD foi desenvolvida para sistemas de dois componentes, e pode ser utilizada para interpretar espectros de massa tanto orgânicos quanto inorgânicos (OUERDANE et al., 2009). Os cálculos de IPD encontram-se abaixo resumidos nas equações 2 e 3, considerando “A” como abundância isotópica, “x” como fração molar, “s” para amostra, “t” para traçador ou *spike* (“a” é o traçador presente na amostra e “b” é o traçador adicionado para quantificação), “m” é a mistura de amostra e *spike*, “N” é número de mols e 1, 2 e n são os isótopos do elemento a ser analisado (adaptado de GARCIA ALONSO; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, 2013).

$$\text{Equação (2)} \quad \begin{bmatrix} A_m^1 \\ A_m^2 \\ \vdots \\ A_m^n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_s^1 & A_{t,a}^1 & A_{t,b}^1 \\ A_s^2 & A_{t,a}^2 & A_{t,b}^2 \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ A_s^n & A_{t,a}^n & A_{t,b}^n \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} x_s \\ x_{t,a} \\ x_{t,b} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^1 \\ e^2 \\ \vdots \\ e^n \end{bmatrix}$$

$$\text{Equação (3)} \quad x_{t,a} N_m = N_{t,a}$$

Estudos utilizando a técnica de IPD podem ser muito úteis para experimentos clínicos, nutricionais e ambientais. Como no experimento realizado por González Iglesias et al. (2007) em que se utilizou IPD para diferenciar os níveis de selênio endógeno e os ingeridos através de suplementos alimentares em ratos em período de amamentação. Neste estudo foram utilizados dois isótopos de selênio enriquecidos, o ^{77}Se que foi ingerido através de uma fórmula de leite e utilizado como traçador metabólico e o ^{74}Se que foi utilizado como traçador de quantificação para as análises do ^{77}Se em amostras de sangue e urina dos ratos. Outro exemplo foi o experimento realizado por Rodríguez-González et al. (2005) os quais utilizaram IPD em combinação com IDA para acompanhar simultaneamente a distribuição nos tecidos, a degradação e a absorção de três compostos butil-estânicos ao longo de suas rotas metabólicas em ratos de laboratório.

6.2.6 Determinação da concentração de ^{116}Cd nas amostras

Determinou-se as concentrações de ^{116}Cd em cada amostra (água do mar, *B. caissarum*, *P. perna* e extratos de proteínas) através de ID e IPD utilizando-se o ICP-MS Thermo XSeries^{II}. Uma solução de *tuning* (calibração) multi-elementar foi usada para conferir a performance do instrumento antes de cada análise. A determinação de Cd nas amostras controle, nas quais não houve adição de ^{116}Cd , foi conduzida por ID adicionando-se o mesmo *spike* enriquecido no isótopo ^{116}Cd aos extratos antes da análise no ICP-MS. Para a determinação de ^{116}Cd nas amostras dos microcosmos nos quais houve adição de ^{116}Cd conduziu-se a análise de IPD adicionando-se um *spike* de quantificação enriquecido no isótopo ^{111}Cd aos extratos das amostras incubadas com ^{116}Cd . A abundância isotópica do *spike* enriquecido no isótopo ^{111}Cd era de 0,1% de ^{116}Cd , 0,66% de ^{114}Cd , 0,46% de ^{113}Cd , 1,92% de ^{112}Cd , 96,21% de ^{111}Cd , 0,62% de ^{110}Cd , 0,01% de ^{108}Cd e 0,01% de ^{106}Cd . Todos os *spikes* isotopicamente enriquecidos foram caracterizados através de ID reversa analisando-se o *spike* isotopicamente enriquecido, uma solução padrão estoque do elemento (Cd ou Zn) e uma mistura destes (1:1). As alíquotas dos *spikes* adicionados para as análises ID ou IPD foram sempre pesadas para a realização dos cálculos. O ^{116}Cd foi corrigido para a interferência isobárica do ^{116}Sn . Por fim, as concentrações de ^{116}Cd nas amostras foram calculadas através de IPD. O RSD (desvio padrão relativo) das determinações de Cd na água do mar foi em média 0,01% e o RSD médio das determinações de Cd nos tecidos dos organismos e nos extratos de proteínas dos tecidos dos organismos foi de 0,001%.

6.2.7 Cromatografia líquida

Para a realização de separações cromatográficas utilizou-se uma coluna SEC (cromatografia de exclusão por tamanho) Superdex 200 (10 mm i.d. x 300 mm, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) acoplada a um cromatógrafo líquido HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) Agilent 1100 series (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). O HPLC utilizado era equipado com um desgaseificador em linha, uma bomba binária, um auto-amostrador e um detetor de arranjo de fotodiodos (UV-VIS). Utilizou-se para o acoplamento da coluna SEC ao ICP-MS uma bomba de pistão duplo (LC10AD, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) e uma válvula de injeção

com seis posições (Rheodyne model 9125, Cotati, CA, USA). A fase móvel utilizada para as análises SEC-UV/Vis e SEC-ICP-MS foi constituída de uma solução de acetato de amônio 50 mM (Sigma-Aldrich) de pH 7,0 a uma vazão de 0,6 mL min⁻¹. O volume de injeção de amostra foi de 50 µL. Todos os extratos de *B. caissarum* e *P. perna* foram analisados por SEC-UV/Vis e SEC-ICP-MS a fim de monitorar o Cd e o Zn. Após estas análises, as frações que continham Cd ou Zn foram isoladas, recolhendo-se as frações e filtrando-as através do uso de Amicon® Ultra 0,5 mL (Millipore) de tamanhos 100 kDa e 3 kDa, e depois foram liofilizadas para serem posteriormente analisadas utilizando a técnica de espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI-MS).

6.2.8 Análises de ESI-MS

Na tentativa de identificar proteínas associadas ao Cd ou ao Zn nas frações dos extratos de *B. caissarum* e *P. perna*, após estas frações terem sido isoladas e liofilizadas foram submetidas à uma digestão enzimática (digestão trípica). Para a digestão trípica em solução, as amostras foram reduzidas através de incubação com 1,4-ditiotreitol 100 mmol L⁻¹ (DTT, Sigma-Aldrich) e bicarbonato de amônio 50 mmol L⁻¹ (99%, Sigma-Aldrich) a 95°C por 5 minutos. Subsequentemente, adicionou-se a esta solução, uma solução de alquilação recém preparada de 100 mmol L⁻¹ de iodoacetamida e a solução resultante ficou reagindo por 20 minutos a temperatura ambiente e sob proteção da luz. Finalmente, uma solução de tripsina (TPCK-treated, Sigma-Aldrich) foi preparada pouco antes do uso, a uma concentração de 0,1 µg µL⁻¹. Resumindo, adicionou-se a 10 µL de cada solução de amostra 15 µL de bicarbonato de amônio 50 mmol L⁻¹ (pH = 8.0), 1,5 µL de DTT 100 mmol L⁻¹, 3 µL de iodoacetamida 100 mmol L⁻¹ e 1 µL de solução de tripsina. A digestão foi realizada durante a noite (15 h) a 37°C. Para a análise no ESI-MS, as soluções foram tratadas com ponteiros de pipeta *ZipTip* (Millipore, USA) e finalmente eluídas em acetonitrila 70% (99,9%, Fisher, Geel, Belgium)/ácido fórmico 0,1% (> 98%, Merck).

As frações liofilizadas que não foram digeridas com tripsina foram diretamente reconstituídas em acetonitrila 70%/ácido fórmico 0,1% para uma concentração apropriada e foram submetidas à uma extração em fase sólida (*ZipTip*, Millipore, USA). Através desta extração, as amostras foram purificadas, através da eliminação de

possíveis sais presentes, e pré-concentradas. Após este procedimento, as amostras foram injetadas em um instrumento ESI-Q-TOF (espectrômetro de massas quadrupolo-tempo de voo com ionização por *electrospray*) a uma vazão de 4 $\mu\text{L min}^{-1}$. O equipamento ESI-Q-TOF utilizado foi um modelo QStar XL (*Applied Biosystems*) equipado com uma fonte de ionização por *electrospray* (voltagem 4 kV). O gás nebulizador utilizado foi o nitrogênio (N_2). A calibração de massa foi realizada diariamente utilizando-se uma solução padrão de reserpina (1 pmol μL^{-1}). A partir do espectro de massas completo da mistura de peptídeos de cada amostra, obtido por ESI-MS, cada íon produto dos picos carregados foi selecionado e fragmentado através de MS/MS. O espectro de fragmentação dos peptídeos foi gerado através de dissociação induzida por colisão (CID), utilizando N_2 como gás de colisão. A CID é utilizada em sistemas de espectrometria de massas sequencial (MS/MS) para a determinação estrutural de íons e componentes de misturas complexas. Esta gera fragmentos provenientes da dissociação de um íon precursor que podem fornecer informações estruturais úteis para a sua identificação. As variações de massa/carga dos peptídeos foram de m/z 400 a 2000 Da no modo TOF-MS, e de 100 a 1500 Da no modo MS/MS.

Para a identificação de proteínas uma pesquisa na base de dados do programa *SwissProt* foi realizada através de uma busca por fragmentos de peptídeos. Após esta busca, uma lista de massas de fragmentação foi criada a partir dos dados experimentais MS/MS e, em seguida, comparados com as massas de fragmentação teórica de todos os peptídeos da base de dados. Em seguida, utilizando-se o painel de resultados de busca, as proteínas que continham sequências de peptídeos combinando com a lista de massas dos íons fragmentados foram identificadas e a porcentagem da combinação entre os dados teóricos e o espectro MS foi indicada. A base de dados do programa *uniprot* (uniprot.org) foi utilizada para a obtenção de informações sobre as proteínas encontradas.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a aplicação da técnica de IPD foi possível determinar a concentração do traçador isopicamente enriquecido em ^{116}Cd presente nos compartimentos dos

microcosmos (água do mar, *B. caissarum* e *P. perna*). Os dados obtidos serão apresentados nas próximas seções.

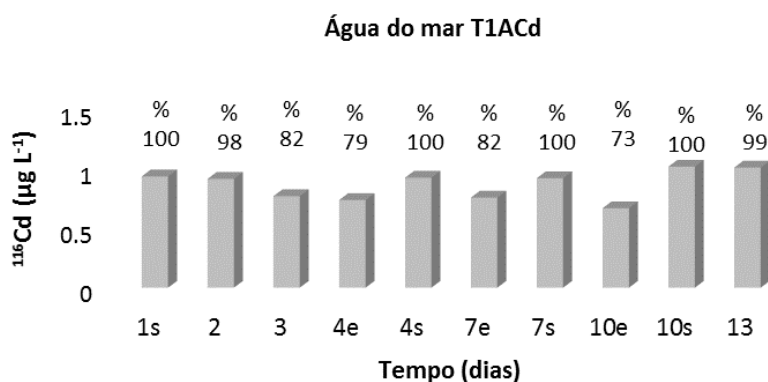
6.3.1 Concentrações de ^{116}Cd na água do mar

Nos microcosmos com *B. caissarum* as concentrações de ^{116}Cd na água do mar filtrada decresceram com o tempo, provavelmente devido à incorporação de Cd por *B. caissarum*, mas também à adsorção ao MPS e aos vidros dos aquários. As concentrações de ^{116}Cd na água do mar filtrada dos microcosmos T1ACd estão apresentadas na Figura 42a. Nesta figura as concentrações do *spike* de ^{116}Cd adicionado nos dias 1, 4(s), 7(s) e 10(s) (s significa imediatamente após a nova adição de *spike*) são consideradas 100% (concentração imediatamente após adição). Após os primeiros quatro dias, a concentração de ^{116}Cd adicionado no primeiro dia (dia 1) foi reduzida para 79% da concentração inicial. Posteriormente, no quarto dia (4(s)) uma nova adição de *spike* ocorreu e no dia 7(e) (e significa antes da nova adição de *spike*) a concentração de ^{116}Cd decresceu para 82% da concentração no quarto dia (4(s)). Houve uma nova adição de *spike* no dia 7(s) e no dia 10(e) o ^{116}Cd foi reduzido para 73% da concentração do dia 7(s). A última adição de *spike* foi no dia 10(s), e no dia 13 o ^{116}Cd na água do microcosmos decresceu para 99% da concentração no dia 10(s). Esta redução foi bastante inferior aos outros dias do experimento. Este comportamento provavelmente significa que *B. caissarum* atingiu um limite de saturação ou um equilíbrio e não foi possível acumular mais ^{116}Cd ou este metal estava menos biodisponível no meio.

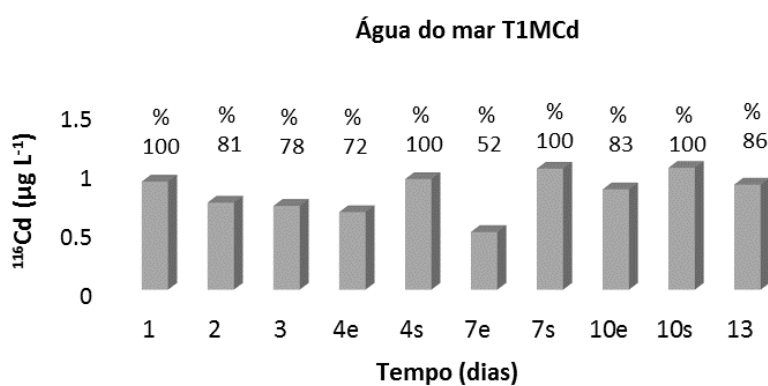
As concentrações de ^{116}Cd na água do mar filtrada dos microcosmos com *P. perna* (tratamentos T1MCd e T2MCd) estão apresentadas nas Figuras 42b e 42c. A partir destas figuras, pode-se observar que após os primeiros quatro dias de experimento a concentração do ^{116}Cd na água dos microcosmos decresceu para 72% da concentração inicial (dia 1) no tratamento T1MCd e para 76% no tratamento T2MCd. No dia 4(s) uma nova adição de *spike* ocorreu e no dia 7(e) a concentração do ^{116}Cd adicionado no dia 4(s) foi reduzida para 52% no tratamento T1MCd e 88% no tratamento T2MCd. Após a nova adição de *spike* no dia 7(s) as concentrações de ^{116}Cd decresceram para 83% no tratamento T1MCd e 89% no tratamento T2MCd no dia 10(e). A última adição de *spike* foi no dia 10(s), e no dia 13 o ^{116}Cd foi reduzido

para 86% da concentração do dia 10(s) no tratamento T1MCd e para 90% no tratamento T2MCd. Estas reduções dos últimos dias nos microcosmos com *P. perna* foram em geral inferiores às dos dias anteriores. Comparando-se as concentrações de ^{116}Cd na água do mar nestes microcosmos às da água do mar nos sistemas contendo *B. caissarum*, as concentrações do primeiro no último dia foram inferiores. Portanto, provavelmente os espécimes de *P. perna* ainda poderiam reter mais ^{116}Cd em seus tecidos. Os mexilhões podem bioacumular elevadas quantidades de metais dos ambientes que eles habitam (RAINBOW, 1995). Isso ocorre devido ao fato de que, além dos mexilhões serem filtradores, suas brânquias, que funcionam como membranas, são expostas diretamente à água do mar, o que torna facilitado o contato.

1a)



1b)



1c)

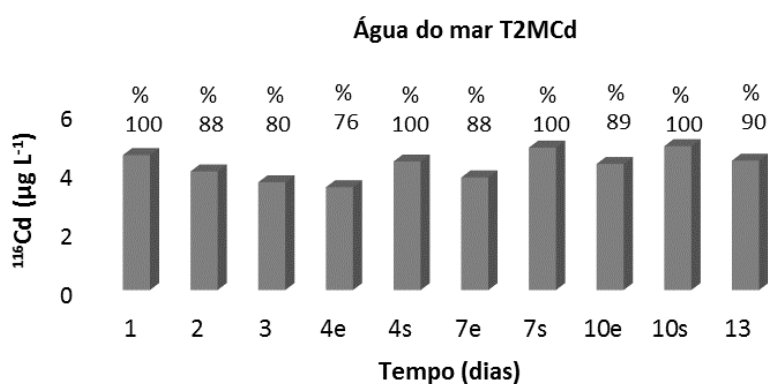


Figura 42 - Concentrações de ^{116}Cd na água do mar filtrada do: 1a) microcosmos contendo *B. caissarum* (T1ACd), 1b) microcosmos contendo *P. perna* - tratamento 1 (T1MCd) e 1c) microcosmos contendo *P. perna* - tratamento 2 (T2MCd). A letra “e” representa medida antes da nova adição de *spike* e a letra “s” representa medida logo após a nova adição de *spike*. O RSD (desvio padrão relativo) das determinações de ^{116}Cd na água do mar foi em média 0,01%.

6.3.2 Concentrações de ^{116}Cd em *B. caissarum* e *P. perna*

De modo a conferir a qualidade dos resultados obtidos, estudos de recuperação de Cd foram desenvolvidos utilizando-se os materiais certificados NIST 1566b (tecido de ostra) e BCR 278R (tecido de mexilhão). A combinação do procedimento de digestão e a análise IDMS resultou em uma recuperação de $95,3 \pm 0,7\%$. Nos microcosmos contendo água do mar e *B. caissarum*, todos os espécimes foram capazes de incorporar Cd a partir do *spike* de ^{116}Cd (Figura 43). Os espécimes apresentaram um fator de bioconcentração (FBC) médio de 80,5.

Há poucos estudos sobre FBC em *B. caissarum*, nenhum destes utilizando o elemento Cd. No experimento de 6 dias de incorporação de ^{203}Hg , *B. caissarum* apresentou um FBC médio de 70 (RIZZINI-ANSARI et al., 2015). Em uma incubação com *Anthopleura elegantissima*, uma anêmona-do-mar de clima temperado, espécimes foram expostos a $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd por 14 dias e, após o experimento, as concentrações determinadas nos tecidos foram de aproximadamente $3000 \mu\text{g kg}^{-1}$ peso seco (MITCHELMORE et al., 2003a). Se calculássemos o FBC de Cd para estas espécies este seria próximo a 150. Nesse experimento, as concentrações nos tecidos dos espécimes foram mais elevadas em comparação com o presente estudo. Apesar das elevadas concentrações de exposição utilizadas neste experimento com *A. elegantissima*, esta espécie de anêmona-do-mar demonstrou grande capacidade de bioacumular cádmio (MITCHELMORE et al., 2003a).

Nos microcosmos com água do mar e *P. Perna*, também todos os espécimes foram capazes de bioacumular Cd a partir do *spike* ^{116}Cd (Figura 43). Os espécimes de *P. perna* alcançaram um FBC médio de 850 em T1MCd e 530 em T2MCd. Os espécimes expostos à concentrações maiores apresentaram FBC menor. De acordo com DeForest et al. (2007) os FBCs são geralmente inversamente proporcionais às concentrações de exposição. Após um experimento de incubação de 7 dias com mexilhões *Perna viridis* em água do mar com uma concentração de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd estável dissolvido ($\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), as concentrações de Cd em seus tecidos foram de aproximadamente $1,5 \text{ mg kg}^{-1}$ peso seco (NG et al., 2007). Calculando-se o FBC, este seria próximo a 300. Apesar do período de incubação ter sido mais curto, o *P. viridis* parece apresentar um FBC de Cd ligeiramente inferior ao de *P. perna*.

No tratamento 1, as concentrações de Cd nos tecidos de *P. perna* foram de 10 vezes mais elevadas que em *B. caissarum* (Figura 43). Diferentes concentrações de Cd eram esperadas, já que estas espécies têm hábitos alimentares e fisiologias bastante distintos. Para os espécimes de *P. perna* do tratamento 2 (T2MCd) as concentrações de Cd em seus tecidos encontram-se acima dos limites de ingestão pela legislação brasileira (Anexo 4) e os espécimes do tratamento 1 (T1MCd) têm concentrações próximas ou um pouco acima deste limite. Assim, espécimes de *P. perna* provenientes de águas com concentrações entre 0,9 e 4,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cd não são indicados para o consumo humano.

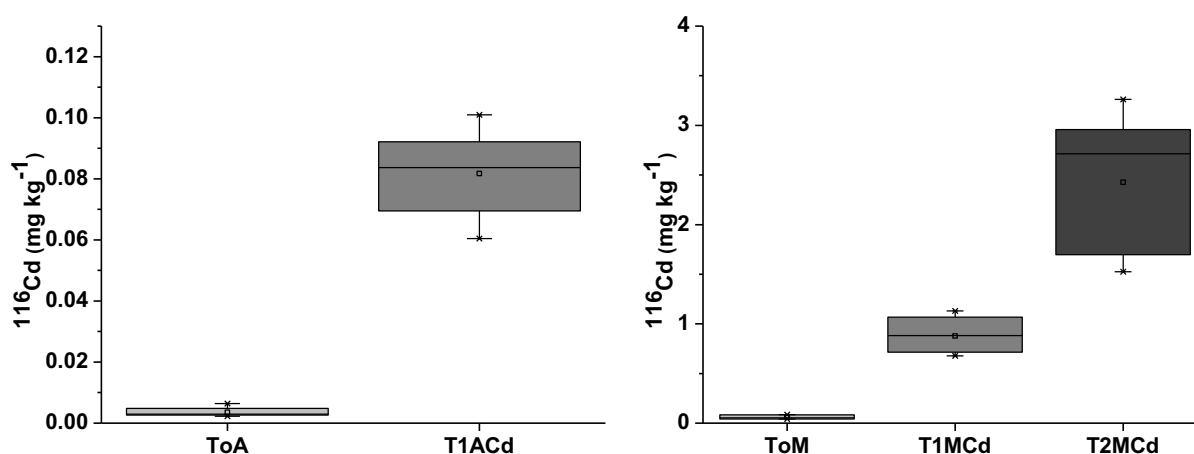


Figura 43 - Concentrações de ^{116}Cd em *B. caissarum* (ToA (controle) e T1ACd (tratamento 1) e em *P. perna* (ToM (controle), T1MCd (tratamento 1) e T2MCd (tratamento 2)). O RSD médio das determinações de Cd nos tecidos dos organismos foi de 0,001%.

6.3.3 Recuperação de Cd utilizando diferentes procedimentos de extração de proteínas

Além da concentração de Cd total, a forma na qual este elemento é bioacumulado é de grande interesse para uma melhor compreensão da acumulação em si e de potenciais mecanismos de detoxificação. Com esta finalidade, utilizando-se os materiais de referência NIST 1566b e BCR 278R, diferentes procedimentos de extração, que em geral garantem a estabilidade de, por exemplo, complexos de metal-proteína, foram testados quanto a sua eficiência de extração como indicado na Tabela 9. Mounicou et al. (2002) utilizaram diferentes procedimentos de extração para

amostras de cacau e observaram que em temperaturas mais elevadas da água a média do rendimento da extração de Cd foi aumentada para aproximadamente 50%. No presente estudo, utilizando uma matriz bastante diferente, este comportamento foi observado apenas para os procedimentos de extração de A a E.

Tabela 9 - Porcentagem do Cd total, presente nos materiais de referência NIST 1566b e BCR 278R, extraído da fração citosólica a partir de diferentes procedimentos de extração

Método	Procedimento de extração	Porcentagem (%)
A	Acetato de amônio 10 mM, PMSF 0,01 mM, agitação por 4h a 20°C	15.3
B	Acetato de amônio 10 mM, PMSF 0,01 mM, agitação por 4h a 37°C	20.6
C	Acetato de amônio 10 mM, PMSF 0,01 mM, ultrassom por 4h a 38°C	23.8
D	Acetato de amônio 10 mM, PMSF 0,01 mM, 2-ME 5 mM, agitação por 4h a 20°C	5.3
E	Acetato de amônio 10 mM, PMSF 0,01 mM, 2-ME 5 mM, agitação por 4h a 37°C	6.8
F	Tris-HCl (tampão) 10 mM pH 7,4, PMSF 0,01 mM, agitação por 4h a 20°C	11.7
G	Tris-HCl (tampão) 10 mM pH 7,4, PMSF 0,01 mM, agitação por 4h a 37°C	6.3
H	Tris-HCl (tampão) 10 mM pH 7,4, PMSF 0,01 mM, 2-ME 5 mM, agitação por 4h a 20°C	10
I	Tris-HCl (tampão) 10 mM pH 7,4, PMSF 0,01 mM, 2-ME 5 mM, agitação por 4h a 37°C	8
J	Tris-HCl (tampão) 10 mM pH 7,4, NaCl 25 mM, PMSF 0,01 mM, 2-ME 5 mM, agitação por 4h a 37°C	38
K	Tris-HCl (tampão) 10 mM pH 7,4, NaCl 25 mM, PMSF 0,01 mM, 2-ME 5 mM, ultrassom por 4h a 38°C	38

6.3.4 Extração de Cd da fração citosólica dos tecidos de *B. caissarum* e *P. perna*

Devido à uma maior eficiência de extração de Cd (38%) por meio do método de extração K comparado à maioria das demais soluções de extração, foi decidido utilizar este método. É sabido que o uso do 2-ME (mercaptoetanol) ou o DTT (ditiotreitól), em soluções para extração de citosol mantém as condições redutoras e aumenta o rendimento de separações bioquímicas (LOBEL, 1989). Este também foi

outro motivo para a escolha de uma solução contendo 2-ME para as futuras separações cromatográficas. Após selecionado o método K para a extração de proteínas, amostras liofilizadas de *B. caissarum* e *P. perna* foram extraídas utilizando-se este procedimento.

Após a extração das proteínas citosólicas em cada espécime de *B. caissarum* do tratamento T1ACd, encontrou-se nos extratos concentrações médias de ^{116}Cd de $35 \mu\text{g kg}^{-1}$. Assim, a porcentagem do ^{116}Cd total presente na fração citosólica dos espécimes foi cerca de 43%. Quanto à média da concentração de ^{116}Cd nos extratos de *P. perna* (T1MCd), esta foi de $396 \mu\text{g kg}^{-1}$. Com isso, 45% do *spike* de ^{116}Cd foram encontrados na fração citosólica. No segundo tratamento (T2MCd), a porcentagem do ^{116}Cd total na fração proteica foi 55%, superior ao primeiro tratamento, e a média das concentrações citosólicas foi de $1363 \mu\text{g kg}^{-1}$. Portanto, estes resultados indicaram que o rendimento de extração de ^{116}Cd na fração citosólica de todas as amostras foi superior à recuperação do material de referência, especialmente para o tratamento T2MCd, que apresentou maiores concentrações de Cd. Assim, as concentrações na fração citosólica das amostras foram aproximadamente 50% de seu conteúdo total de ^{116}Cd . Portanto, o Cd estava praticamente igualmente distribuído entre frações solúvel e insolúvel. Além disso, com crescentes concentrações nos tratamentos com *P. perna* a distribuição de Cd parece aumentar na fração solúvel. A maior presença de Cd no citosol é importante para a compreensão do quanto os metais influenciam no metabolismo destas espécies. O RSD médio das determinações de Cd nos extratos de proteínas dos tecidos dos organismos foi de 0,001%.

6.3.5 Especificação elementar de Cd em *B. caissarum* e *P. perna*

Os extratos de *B. caissarum* e *P. perna* obtidos foram posteriormente analisados por SEC-UV/Vis e SEC-ICP-MS para o monitoramento do Cd. De modo a monitorar a fração orgânica (NG et al., 2007) os comprimentos de onda de 254 e 280 nm foram selecionados, como mostra a Figura 44 para as três diferentes amostras. A Figura 45 apresenta os cromatogramas correspondentes com detecção por ICP-MS.

Ng et al. (2007) definiram para mexilhões *P. viridis* as frações com tamanho molecular $>20.000 \text{ Da}$ como PAPM, entre 7.000 e 20.000 Da como PSMT e <7.000

Da PBPM. Considerando esta definição, as frações das amostras foram classificadas de acordo com o peso molecular aproximado obtido por SEC (Figura 44a). As PSMTs foram consideradas até aproximadamente 5 kDa, pois em estudos anteriores encontrou-se PSMTs menores que 7 kDa, como para a esponja *Spongia officinalis* (BERTHET et al., 2005). Pode ser observado pelos cromatogramas nas Figuras 44 e 45 que as proteínas citosólicas nos tecidos de ambos *B. caissarum* e *P. perna* apresentaram PAPMs (pico 1), PSMTs (pico 2) e PBPMs (pico 3) ligados ao ^{116}Cd . Ng e Wang (2005) notaram que as PAPMs podem agir como um sítio temporário para a estocagem de metais quando espécimes do mexilhão *P. viridis* têm o primeiro contato com o metal, ou seja, logo após a absorção do metal. Ng et al. (2007) observaram em incubações com *P. viridis* expostos ao ^{109}Cd que este isótopo de Cd não apenas se associou a PSMTs, mas também estava presente em PAPMs e PBPMs. Os autores também observaram que a incorporação de ^{109}Cd a PAPMs aumentou linearmente com o tempo, enquanto nas frações PSMTs e PBPMs poucas relações lineares significativas foram observadas. Além disso, a incorporação de ^{109}Cd foi mais elevada nas PAPMs.

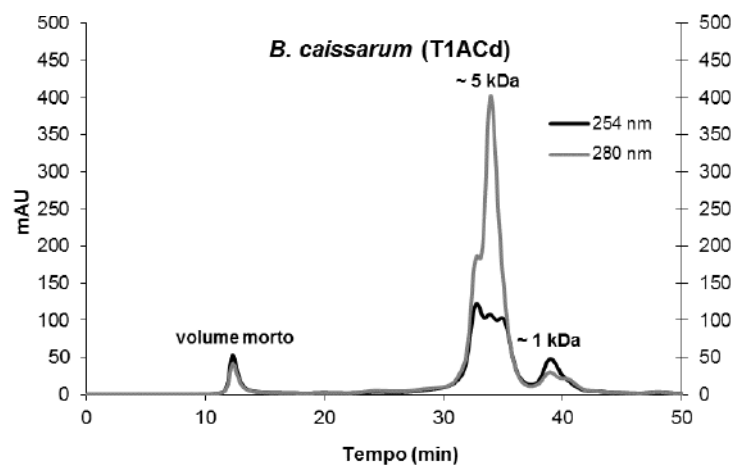
Em incubações com mexilhões *P. viridis* Ng et al. (2007) encontraram uma tendência crescente nas concentrações de MTs a medida que as concentrações de exposição de Cd aumentavam. Os autores também observaram, a partir da distribuição citosólica de Cd em *P. viridis* expostos a Cd dissolvido, que além das MTs, as PAPMs também foram importantes para a associação ao Cd. Geffard et al. (2005) encontraram uma forte correlação entre a concentração de MTs e os níveis de metais citosólicos, incluindo o Cd, nas glândulas digestivas de mexilhões *Mytilus edulis*. Já as concentrações de MTs nas brânquias não refletiram bem a contaminação por metais. Bebianno e Machado (1997) reportaram correlações significativas entre as concentrações de MTs e de Cd nos tecidos de *Mytilus galloprovincialis* da costa sul de Portugal.

Poucos foram os estudos realizados sobre a influência da exposição a metais em anêmonas-do-mar quanto a proteínas como biomarcadores. Os poucos exemplos existentes incluem o estudo de glutathiona (GSH) em *Anthopleura elegantissima*, no qual uma redução significativa dos níveis de GSH foi observada após 14 dias de exposição a $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd, uma concentração bastante alta comparada aos níveis encontrados em ambientes naturais (MITCHELMORE et al., 2003a); outro estudo

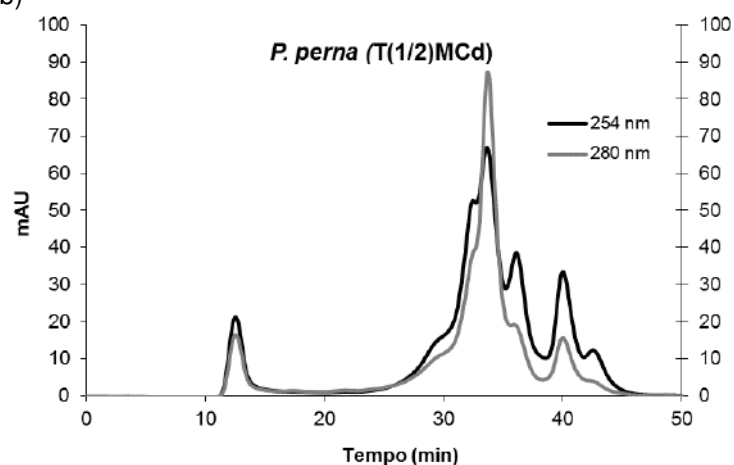
mediu os níveis de atividade de anidrase carbônica em anêmonas-do-mar *Condylactis gigantea* e *Stichodactyla helianthus* expostas a cobre, níquel, chumbo e vanádio, cujos níveis decresceram com o aumento das concentrações (GILBERT; GUZMÁN, 2001); um último exemplo foi a determinação da atividade de enzimas de estresse oxidativo (superóxido dismutase e catalase) na anêmona *Aiptasia pallida* exposta ao cobre, a qual se mostrou sensível a concentrações ambientalmente relevantes (MAIN et al., 2010).

Muitas pesquisas têm sido realizadas sobre MTs, sobre outras proteínas que se associam a metais e também a respeito de diferentes biomarcadores em mexilhões e outros invertebrados aquáticos, especialmente de países temperados. Entretanto, há uma escassez de estudos que utilizam espécies de países tropicais.

a)



b)



c)

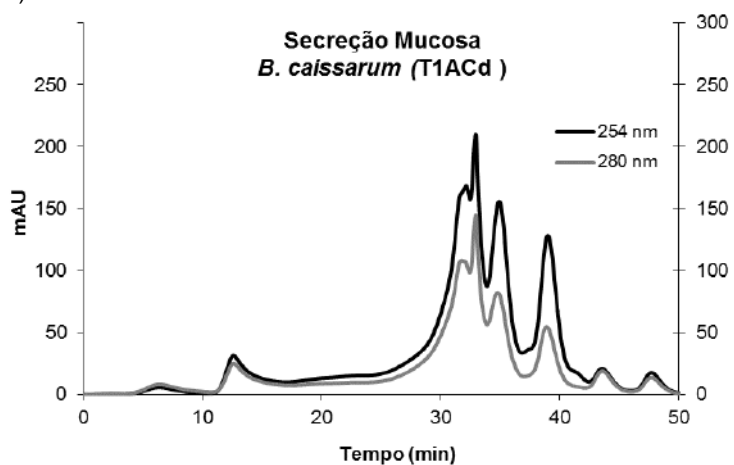


Figura 44 - Cromatogramas SEC-UV/Vis de extratos (a) *B. caissarum* (T1ACd - tratamento 1). (b) *P. perna* (T(1/2)MCd- tratamentos 1 e 2) e (c) secreção mucosa de *B. caissarum*.

Assim como as concentrações determinadas nos tecidos de *P. perna* foram cerca de 10 vezes mais elevadas que as de *B. caissarum*, intensidades de sinal significativamente superiores também foram obtidas nas frações citosólicas nos cromatogramas de *P. perna*, especialmente no pico 2 (Figura 45). Entretanto, qualitativamente nenhuma diferença significativa pôde ser observada entre estas duas espécies, pois o Cd se associou à fração similar (tempo de retenção similar do pico 2) nos cromatogramas de *P. perna* e *B. caissarum*. Assim, uma similar via de acumulação é possível. As frações associadas ao Cd nos tecidos de *B. caissarum* apresentaram uma distribuição de Cd diferente da distribuição na sua secreção mucosa (Figura 45). No cromatograma da secreção mucosa, há um pico adicional a ~ 22 min, indicando uma outra fração com alta afinidade ao ^{116}Cd (Figura 45d). Este padrão específico não pôde ser observado em nenhum outro tipo de amostra e pode estar relacionado a um mecanismo de defesa para a excreção de compostos indesejados ou tóxicos, como o Cd. Isto pode explicar também as altas proporções de ^{116}Cd encontradas nas secreções mucosas (comprovadas pelas razões isotópicas 114/116 de Cd apresentadas abaixo).

P. perna e *B. caissarum* parecem bioacumular o ^{116}Cd em um padrão diferente das razões isotópicas 114/116 de Cd nos picos dos dois cromatogramas. As razões isotópicas 114/116 de Cd nos picos 1 e 2 em *P. perna* foram respectivamente 0,29 e 0,34 (T1MCd) e 0,72 e 0,27 (T2MCd). Enquanto que em *B. caissarum* foram respectivamente 2,7 e 0,44. Também pode ser notado a partir das razões isotópicas 114/116 de Cd que *P. perna* nos tratamentos T1MCd e T2MCd apresentou um padrão diferente, especialmente para a fração do pico 1. Isto demonstra que com maiores concentrações de exposição *P. perna* bioacumulou menos ^{116}Cd na fração do pico 1 (PAPM). As razões isotópicas 114/116 de Cd na secreção mucosa de *B. caissarum* foram nos picos 1, 2 e 3 respectivamente 0,18, 0,1 e 0,13, muito inferiores às do tecido de *B. caissarum*, ou seja, havia maiores proporções de ^{116}Cd na secreção mucosa do que em seus tecidos.

De modo a obter informações moleculares complementares sobre as espécies associadas as Cd detectadas, frações foram coletadas a partir de SEC, foram liofilizadas, e preparadas para análise utilizando a técnica de espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS).

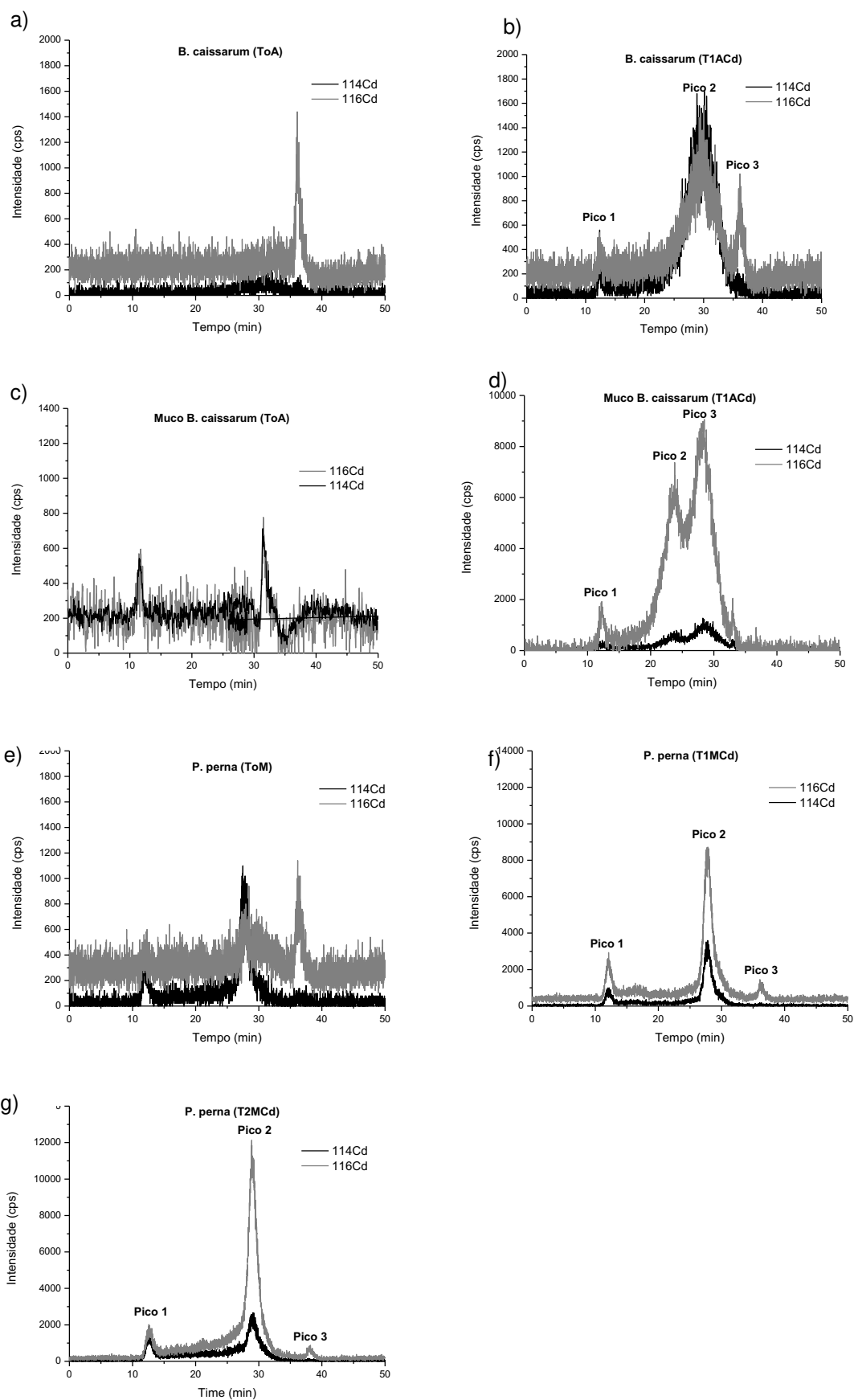


Figura 45 - Cromatogramas SEC-ICP-MS de extratos de *B. caissarum*: (a) ToA (controle), (b) T1ACd (tratamento 1); de secreção mucosa de *B. caissarum*: (c) ToA (controle), (d) T1ACd (tratamento 1); e de *P. perna*: (e) ToM (controle), (f) T1MCd (tratamento 1) e (g) T2MCd (tratamento 2).

6.3.6 Identificação de proteínas através da análise ESI-MS/MS

As frações purificadas separadas por SEC foram analisadas por estudos complementares de ESI-MS/MS a fim de se identificar potenciais proteínas e peptídeos como parceiros de ligação com o Cd. Utilizou-se a combinação da digestão enzimática e a análise ESI-MS/MS com a finalidade de identificar metaloproteínas conhecidas ou desconhecidas com potencial afinidade ao Cd. O mapeamento dos peptídeos gerados pela digestão enzimática das proteínas ligadas ao Cd foi estudado nos extratos dos tecidos de *B. Caissarum* e *P. perna*. Devido às baixas concentrações das frações isoladas somente foi possível obter concentrações suficientes de peptídeos para as amostras da fração de PSMTs de *B. caissarum* (T1ACd). Além disso, deve-se considerar que estas bases de dados apresentam poucos dados a respeito das espécies estudadas, assim, os peptídeos identificados somente puderam ser combinados com proteínas conhecidas de outros organismos. Por meio da análise de ESI-MS/MS obteve-se uma lista de quatro combinações de proteínas (de outros organismos) encontradas na base de dados do programa *SwissProt* para as amostras de tecido de *B. caissarum* (Tabela 10). No entanto, somente duas destas apresentam alta afinidade a metais, ambas encontradas em ouriços-do-mar da espécie *Sphaerechinus granularis*: Metalotioneína-A (Q26497) e Metalotioneína-B (Q26496). Estes resultados indicam que as metalotioneínas provavelmente desempenham um papel fundamental na incorporação e rota metabólica do Cd em *B. caissarum*, porém infelizmente a proteína ou proteínas inteiras (metalotioneínas ou PSMTs) não puderam ser identificadas. A segunda coluna da tabela 10 demonstra que um peptídeo, dentre oito ou sete possíveis, foi encontrado sob forma idêntica à das proteínas MTA e MTB respectivamente e que as porcentagens dos peptídeos identificados, nos quais se rompem estas proteínas, são respectivamente 12,5% para MTA e 14,3% para MTB. Entretanto, não foi possível obter informações sobre a sequência de aminoácidos restante nestas metaloproteínas de *B. caissarum*.

Na base de dados *uniprot* encontram-se 42 proteínas sequenciadas para *P. perna*, porém nenhuma MT ou proteína com afinidade a metais, e 9 proteínas para *B. caissarum*, das quais nenhuma possui afinidade por metais. Não foram encontrados até o presente estudos sobre MTs ou PSMTs em *B. caissarum*. Desta forma, estes dados podem auxiliar na compreensão da incorporação de Cd por *B. caissarum* e

talvez outras espécies de anêmonas-do-mar e incentivar futuras pesquisas quanto à metalotioneínas ou PMSTs nestes organismos.

Tabela 10 - Proteínas identificadas na fração PSMT das amostras T1ACd

m/z	Peptídeos	Massa (Da)	Nome da proteína	ID Proteína
995	1 de 8 → 12.5 %	6561	MTA_SPHGR Metallothionein-A (MTA)	Q26497
	1 de 7 → 14.3 %	6576	MTB_SPHGR Metallothionein-B (MTB)	Q26496
	6 de 12 → 50 %	8892	UPF0109 protein CPn_0720/CP_0026/CPj0720/CpB0748	Q9Z7I5
830	5 de 19 → 26.3 %	7262	60S ribosomal protein L37	P49212

7 BIOACUMULAÇÃO DE ZINCO POR *B. CAISSARUM* E *P. PERNA* E ESTUDOS DE ESPECIAÇÃO DE ZINCO NESTAS ESPÉCIES

7.1 INTRODUÇÃO

O Zinco (Zn) é um metal essencial, tanto a deficiência, quanto a exposição excessiva a este metal nos seres vivos podem gerar efeitos nocivos. Existem diversas metaloenzimas que utilizam o zinco como cofator. Este metal é o 25º mais abundante na crosta terrestre e pode ser encontrado no ar, na água, no solo e está naturalmente presente em alimentos. O Zn ocorre no ambiente, em geral, como Zn^{2+} e pode combinar-se com cloro, oxigênio e enxofre. Na água, o zinco chega aos sedimentos através da adsorção a argilas, óxidos de manganês, ao ferro e a matéria orgânica. Sua remoção varia de acordo com suas concentrações no meio, com o pH, o potencial redox, a salinidade, a presença de complexos ligantes e a capacidade de troca catiônica. Este metal é distribuído no ambiente como resultado de processos naturais e das atividades humanas. As fontes antrópicas de zinco para o meio ambiente são geradas, principalmente, através da mineração, da purificação de zinco, chumbo e cádmio, da produção de aço, da queima de carvão e dos rejeitos urbanos. As fontes de zinco são transportadas para as águas principalmente através dos descartes de efluentes e do escoamento superficial (SILVA, 2003b).

Nem todas as funções das MTs estão totalmente elucidadas. No entanto, é reconhecido que as proteínas citosólicas estão envolvidas no controle homeostático de metais essenciais, como o zinco e o cobre, e na detoxificação de metais essenciais e tóxicos, como o cádmio e o mercúrio, em excesso (AMIARD et al., 2006; GEFFARD et al., 2005; LAVILLA et al., 2012; NG et al., 2007; VIARENGO; NOTT, 1993). As MTs podem ser induzidas pelos metais essenciais Cu e Zn e pelos metais não-essenciais Ag, Cd e Hg, tanto em organismos vertebrados quanto os invertebrados. No entanto, sua indução apresenta uma variação intraespecífica e interespecífica, a indução pode variar de acordo com as características ambientais presentes e fisiológicas do organismo em questão. As MTs podem apresentar diferentes isoformas que possivelmente possuem funções fisiológicas diferentes. Diversas isoformas e polimorfismos foram identificados em invertebrados, além de variações em suas massas moleculares (AMIARD et al., 2006). Além de MTs, as PSMTs, as PAPMs e as

PBPM podem se associar a metais. De acordo com Vasak (1991) a afinidade (*in vitro*) dos metais às proteínas de invertebrados decresce na ordem $Hg^{2+} > Cu^+, Ag^+, Bi^{3+} > Cd^{2+} > Pb^{2+} > Zn^{2+} > Co^{2+}$. Estas afinidades indicam que o Zn apresenta grande probabilidade de ser substituído por diversos metais, inclusive metais considerados tóxicos, como o Hg e o Cd. Geralmente as proteínas não estão saturadas por um único metal, mas por diversos átomos de Cd, Cu, Hg, Zn e Ag, quando presente (AMIARD et al., 2006; ROESIJADI, 1996).

No presente estudo, com a finalidade de compreender melhor o comportamento do Zn quanto à sua associação à metaloproteínas e à biocumulação e distribuição deste metal em microcosmos contendo *B. caissarum* e *P. perna* utilizou-se ^{68}Zn enriquecido. A investigação da especiação de Zn na fração citosólica extraída do tecido de organismos destas espécies é interessante devido à natureza lábil dos complexos Zn-proteínas.

7.2 MATERIAIS E MÉTODOS

7.2.1 Amostragem e aclimação

Um total de 21 espécimes de *Bunodosoma caissarum* e 21 espécimes de *Perna perna* foram simultaneamente coletados em Arraial do Cabo (Ilha de Cabo Frio) ($22^{\circ} 59' 25'' S$ e $41^{\circ} 59' 25'' W$), no estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil. O ponto de amostragem destes espécimes foi o mesmo para as incubações com Cd e os espécimes de ambos os experimentos foram coletados concomitantemente. A coleta dos espécimes ocorreu em fevereiro de 2013 e foi realizada através de mergulho com snorkel. Os espécimes foram cuidadosamente removidos do substrato rochoso e transportados ao laboratório de ecotoxicologia marinha da FAOC (UERJ) em recipientes plásticos contendo água do mar local com aeração. Os organismos foram então aclimatados às condições do laboratório em aquários de 10 L contendo água do mar. Os espécimes de *B. caissarum* e de *P. perna* eram de mesma classe de tamanho, com respectivamente 2,5-3,5 cm de diâmetro e 6-7 cm de comprimento de concha.

Em cada aquário havia sete espécimes de *B. caissarum* ou sete espécimes de *P. perna*. A água do mar de cada aquário esteve sob constante aeração e mantida a aproximadamente 20°C, pH de 8,25 e salinidade de 34,4.

7.2.2 Incubação com ^{68}Zn

O desenho experimental (Figuras 40 e 41) dos microcosmos na incubação com Zn foi similar ao do Cd, porém este consistiu em maior número de aquários e tratamentos. Ao total foram oito aquários de 10 L e quatro tipos de tratamento. O primeiro, denominado To, era o controle e consistia em um aquário contendo água do mar e sete espécimes de *B. caissarum* (chamado ToA) e um outro aquário com água do mar e sete espécimes de *P. perna* (chamado ToM). Neste tratamento, não houve adição de *spikes*. O segundo tipo de tratamento, chamado T1, consistia em um aquário contendo água do mar e sete espécimes de *B. caissarum* (T1AZn) e outro aquário com água do mar e sete espécimes de *P. perna* (T1MZn). Nestes dois aquários um *spike* enriquecido em ^{68}Zn ($^{68}\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, Merck, Alemanha) foi adicionado à coluna d'água de modo a se alcançar uma concentração de aproximadamente $1,4 \mu\text{g L}^{-1}$ de ^{68}Zn na água do mar. O tratamento designado T2, consistia em um aquário contendo água do mar e sete espécimes de *B. caissarum* (T2AZn) e outro aquário contendo sete espécimes de *P. perna* e água do mar (T2MZn). Neste tratamento, o mesmo *spike* enriquecido em ^{68}Zn foi adicionado a cada aquário de modo a se obter uma concentração de aproximadamente $6,9 \mu\text{g L}^{-1}$ de ^{68}Zn na água do mar. O último tratamento, T3, consistia em um aquário contendo água do mar e sete espécimes de *B. caissarum* (T3AZn) e outro aquário contendo sete espécimes de *P. perna* e água do mar (T3MZn). Neste tratamento, o mesmo *spike* enriquecido em ^{68}Zn foi adicionado ao aquário de modo a se obter uma concentração de aproximadamente $34,7 \mu\text{g L}^{-1}$ de ^{68}Zn na água do mar. As concentrações de ^{68}Zn utilizadas no experimento foram escolhidas por serem próximas às encontradas em ambientes marinhos distintos (DONAT; BRULAND, 1995). As incubações também duraram 12 dias com renovação de água do mar sem ^{68}Zn e novas adições do *spike* enriquecido em ^{68}Zn nos dias 1, 4, 7 e 10 para que as concentrações de Zn se mantivessem próximas às concentrações adicionadas no primeiro dia. A solução do *spike* de Zn adicionado à água do mar dos aquários possuía uma concentração de 1010 mg L^{-1} e era

enriquecida com o isótopo ^{68}Zn . As abundâncias isotópicas do *spike* de Zn eram de 0,15% de ^{70}Zn , 86,99% de ^{68}Zn , 1,13% de ^{67}Zn , 4,50% de ^{66}Zn , 7,23% de ^{64}Zn . O *spike* enriquecido em ^{68}Zn adicionado à água do mar resultou em concentrações similares às encontradas em ambientes marinhos (DONAT; BRULAND, 1995). A abundância natural de ^{68}Zn é de 18,75% (Merck (PSE) - <http://pse.merck.de/merck.php>).

Da mesma forma coletou-se amostras de 15 mL da água do mar de cada microcosmo. Porém, neste experimento somente coletou-se amostras de água nos dias 1, 4, 7 e 10, imediatamente após a nova adição de ^{68}Zn , para averiguar a concentração final na água do mar dos microcosmos. Todas as amostras de água do mar foram filtradas utilizando-se filtros 0,45 μm de éster de celulose (Millipore) e foram armazenadas congeladas até o momento da análise. No dia 13, após o experimento de 12 dias, os espécimes de *B. caissarum* e *P. perna* foram lavados com água Milli-Q, armazenados separadamente em sacos plásticos vedados e, então, congelados. Os espécimes de *B. caissarum* expeliram secreção mucosa e amostras desta também foram coletadas para análise. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas para posterior análise. Detalhes sobre as análises estão descritos nas seções a seguir.

7.2.3 Extração dos tecidos de *B. caissarum* e *P. perna* para a determinação de ^{68}Zn total

As amostras liofilizadas de *B. caissarum* e *P. perna* foram maceradas e, em seguida, 50 mg de cada amostra foram pesadas em tubos de microondas de teflon. 6 mL de ácido nítrico concentrado (65%) e 3 mL de peróxido de hidrogênio (30%) foram adicionados em cada tubo de microondas e as amostras foram digeridas em um microondas Milestone Ethos 1 (Soriso, Itália) atingindo uma temperatura de 180°C. Os brancos foram preparados do mesmo modo, sem as amostras. Os materiais de referência NIST 1566b (tecido de ostra) e BCR 278R (tecido de mexilhão) foram digeridos da mesma maneira das amostras para validar as análises. Todas as análises das amostras provenientes do experimento de incubação com ^{68}Zn foram realizadas no Departamento de Química Física y Analítica da Universidad de Oviedo (Espanha).

7.2.4 Extração de proteínas dos tecidos de *B. caissarum* e *P. perna*

Utilizou-se o mesmo procedimento de extração utilizado para o experimento com o Cd (capítulo anterior). Assim, para a extração de proteínas citosólicas associadas ao Zn, 100 mg das amostras liofilizadas de *B. caissarum* e *P. perna* foram extraídas com 10 mL de uma solução de extração constituída de Tris-HCl (tampão) 10 mM pH 7,4, NaCl 25 mM, PMSF 0,01 mM, 2-ME 5 mM e permaneceram no ultrassom por 4h a aproximadamente 38°C.

Após a extração, as suspensões foram centrifugadas por 10 minutos a 7500 rpm. Com a finalidade de separar as frações solúvel e insolúvel o sobrenadante foi filtrado através de filtros de 0,45 µm membranas (MS® PTFE syringe filters, Membrane Solutions, USA).

7.2.5 Determinação da concentração de ^{68}Zn nas amostras

Determinou-se as concentrações de ^{68}Zn em cada amostra (água do mar, *B. caissarum*, *P. perna* e extratos de proteínas) através de ID e IPD utilizando-se um ICP-MS. As análises de Zn foram todas analisadas em um ICP-MS Agilent Technologies 7700x (Agilent Technologies, CA, USA). Uma solução de *tuning* multi-elementar foi usada para conferir a performance do instrumento antes de cada análise. A determinação de Zn nas amostras controle, nas quais não houve adição de ^{68}Zn , foi conduzida por ID adicionando-se o mesmo *spike* enriquecido no isótopo ^{68}Zn aos extratos antes da análise no ICP-MS. Para a determinação de ^{68}Zn nas amostras dos microcosmos nos quais houve adição de ^{68}Zn conduziu-se a análise de IPD adicionando-se um *spike* de quantificação enriquecido no isótopo ^{67}Zn aos extratos das amostras incubadas com ^{68}Zn . A abundância isotópica do *spike* enriquecido no isótopo ^{67}Zn era de 0,07% de ^{70}Zn , 4,10% de ^{68}Zn , 87,67% de ^{67}Zn , 4,16% de ^{66}Zn , 3,99% de ^{64}Zn . Todos os *spikes* isotopicamente enriquecidos foram caracterizados através de ID reversa analisando-se o *spike* isotopicamente enriquecido, uma solução padrão estoque do elemento Zn e uma mistura destes (1:1). As alíquotas dos *spikes* adicionados para as análises de ID ou IPD foram sempre pesadas para a realização dos cálculos. Por fim, as concentrações de ^{68}Zn nas amostras foram calculadas através de IPD.

7.2.6 Cromatografia líquida

As separações cromatográficas foram realizadas por meio da mesma metodologia utilizada para as incubações com ^{116}Cd citada no item X. Assim, todos os extratos de *B. caissarum* e *P. perna* foram analisados por SEC-UV/Vis e SEC-ICP-MS a fim de monitorar o Zn. Após estas análises, as frações que continham Zn foram isoladas, recolhendo-se as frações e filtrando-as através do uso de Amicon® Ultra 0,5 mL (Millipore) de tamanhos 100 kDa e 3 kDa, e depois foram liofilizadas para serem posteriormente analisadas pela técnica ESI-MS.

7.2.7 Análises de ESI-MS

As análises por meio de ESI-MS também foram realizadas utilizando-se a mesma metodologia aplicada para o experimento com ^{116}Cd , citada no capítulo anterior (item 6.2.8), com o intuito de identificar proteínas associadas ao Zn nas frações dos extratos de *B. caissarum* e *P. perna*.

7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a aplicação de IPD foi possível determinar a concentração do *spike* isotopicamente enriquecido em ^{68}Zn adicionado aos microcosmos. Os dados obtidos para a água do mar, *B. caissarum* e *P. perna* serão apresentados nas próximas seções.

7.3.1 Concentrações de ^{68}Zn na água do mar

As concentrações de ^{68}Zn na água do mar dos microcosmos com *B. caissarum* e *P. perna* foram $1,4 \mu\text{g L}^{-1}$ para os microcosmos T1AZn e T1MZn, $6,9 \mu\text{g L}^{-1}$ para os microcosmos T2AZn e T2MZn e $34,7 \mu\text{g L}^{-1}$ para os microcosmos T3AZn e T3MZn.

As concentrações de ^{68}Zn na água do mar não puderam ser acompanhadas ao longo do tempo de incubação de 12 dias. Somente foram medidas as concentrações dos dias em que foi adicionado o ^{68}Zn . Porém, da mesma forma que

foi realizada a incubação com o Cd, também adicionou-se o *spike* enriquecido em ^{68}Zn à água do mar dos aquários no dia 1 e nos dias 4, 7 e 10 renovou-se a água do mar por água sem ^{68}Zn e adicionou-se novamente o *spike* enriquecido em ^{68}Zn para que as concentrações de Zn se mantivessem, ao longo do experimento, próximas às concentrações adicionadas no primeiro dia.

7.3.2 Concentrações de ^{68}Zn em *B. caissarum* e *P. perna*

De modo a conferir a qualidade dos resultados obtidos, estudos de recuperação de Zn foram desenvolvidos utilizando-se os materiais certificados NIST 1566b (tecido de ostra) e BCR 278R (tecido de mexilhão). A combinação do procedimento de digestão e IDMS resultou em uma recuperação de $97,4 \pm 0,5\%$. Nos microcosmos contendo água do mar e *B. caissarum*, todos os espécimes foram capazes de incorporar Zn a partir de exposição *in vivo* ao ^{68}Zn (Figura 14). Os espécimes de *B. caissarum* apresentaram um fator de bioconcentração (FBC) médio de 243 em T1AZn, 398 em T2AZn e 340 em T3AZn. Os FBCs são geralmente inversamente proporcionais às concentrações de exposição (DEFOREST et al., 2007). Porém, neste experimento os espécimes expostos à uma concentração menor (T1AZn) apresentaram um FBC menor que para as outras concentrações (T2AZn e T3AZn). Este comportamento pode ter ocorrido devido ao Zn ser um metal essencial e, com maior disponibilidade deste, foi possível que *B. caissarum* bioacumulasse mais Zn. Já para o tratamento T3AZn, provavelmente *B. caissarum* apresentou um FBC menor que para T2AZn, pois as concentrações de exposição eram aproximadamente cinco vezes maiores e os espécimes possivelmente começaram a ter que regular a incorporação deste metal.

Há poucos estudos sobre FBC em *B. caissarum*. Gouvea et al. (1985) realizaram um experimento em aquários de exposição de espécimes de *B. caissarum* à concentrações de 3,7 kBq do isótopo radioativo ^{65}Zn durante 24h. Neste experimento de incubação de curta duração encontrou-se um FBC médio de 14,5. Os autores também realizaram um experimento de depuração de 24h e durante este experimento *B. caissarum* perdeu somente uma parcela muito pequena do ^{65}Zn que havia sido incorporado anteriormente, apresentando uma meia-vida biológica de 823 h. Devido a este alto valor sugeriu-se uma provável integração biológica do Zn por *B. caissarum*. Gouvea et al. (1985) indicaram *B. caissarum* como bioindicador da

contaminação radioativa marinha para este metal. No experimento de 6 dias de incorporação de ^{203}Hg (RIZZINI-ANSARI et al., 2015 (ver apêndice)), *B. caissarum* apresentou um FBC médio de 70. Enquanto que na incubação de 12 dias com ^{116}Cd (capítulo anterior) *B. caissarum* apresentou um FBC médio de 80,5. Nesta incubação com ^{68}Zn *B. caissarum* apresentou FBCs mais que três vezes maiores que para os metais Cd e Hg. Possivelmente isto ocorreu devido ao Zn ser um metal essencial e somente apresentar toxicidade em concentrações mais altas. Além disso, por ser um metal essencial, *B. caissarum* pode ter estocado o Zn para a síntese de metaloenzimas ou para alguma demanda metabólica ou então possivelmente possui mecanismos de detoxificação deste metal mais lentos que para os metais mais tóxicos. Em uma incubação com *Anthopleura elegantissima*, uma anêmona-do-mar de clima temperado, espécimes foram expostos a $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de Zn e após 21 dias de exposição as concentrações medidas nos tecidos foram de aproximadamente 300 mg kg^{-1} peso seco (MITCHELMORE et al., 2003b). Se calculássemos o FBC de Zn para estas espécies este seria próximo a 3000. Apesar das elevadas concentrações de exposição utilizadas em experimentos com *A. elegantissima*, esta espécie de anêmona-do-mar demonstrou grande capacidade de bioacumular cádmio (MITCHELMORE et al., 2003a) e Zn (MITCHELMORE et al., 2003b).

Nos microcosmos com água do mar e *P. Perna*, também todos os espécimes foram capazes de bioacumular Zn a partir do *spike* ^{68}Zn (Figura 46). Os espécimes de *P. perna* alcançaram um FBC médio de 1789 em T1MZn, 1238 em T2MZn e 621 em T3MZn. Neste experimento os espécimes de *P. Perna* expostos às concentrações maiores apresentaram FBC menor, seguindo a tendência de os FBCs serem geralmente inversamente proporcionais às concentrações de exposição (DeForest et al., 2007). Anandraj et al. (2002) realizaram um experimento no qual *P. perna* foi incubado por 24 dias com Zn estável ($\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) em água do mar com uma concentração de aproximadamente $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de Zn. Após 16 dias de incubação os espécimes apresentaram uma média de concentração de Zn em seus tecidos de 194 mg kg^{-1} peso seco. Calculando-se o FBC, este seria próximo a 3880. Este FBC encontrado é bastante alto comparando-se aos encontrados no presente estudo. Deve-se levar em consideração que no experimento de Anandraj et al. (2002) mediu-se a concentração de Zn na água do mar não-filtrada, pois o estudo não menciona a filtração. De qualquer forma o FBC parece bastante alto para uma concentração de exposição a níveis relativamente altos de Zn. Estes autores observaram durante a

exposição de *P. perna* a Zn^{2+} uma diminuição da incorporação de oxigênio em relação ao controle.

A acumulação de ^{68}Zn nos tecidos de *B. caissarum* e *P. Perna* refletiu fortemente o aumento do gradiente de concentração ao qual os espécimes foram expostos nas incubações. Para as incubações com Zn as concentrações deste metal nos tecidos de *P. perna* apresentaram diferenças um pouco menores em relação as concentrações encontradas em *B. caissarum* comparadas as encontradas no experimento com Cd. No tratamento 1, as concentrações de Zn nos tecidos de *P. perna* foram 7 vezes mais elevadas que em *B. caissarum* (Figura 46). No tratamento 2, as concentrações de Zn nos tecidos de *P. perna* foram 3 vezes mais elevadas que em *B. caissarum*. Já para o tratamento 3, as concentrações de Zn nos tecidos de *P. perna* foram somente 1,8 vezes mais elevadas que em *B. caissarum*. Desta forma, pode-se concluir que com concentrações crescentes de exposição a Zn *P. perna* e *B. caissarum* tendem a acumular níveis de Zn cada vez mais próximos. A obtenção destes dados de bioacumulação de Zn para *P. perna* e *B. caissarum* possibilita a utilização destas espécies como biomonitores de Zn para concentrações na água do mar próximas as utilizadas neste experimento. Assim, para concentrações de Zn encontradas em tecidos de espécimes amostrados em ambientes naturais, é possível, através da confecção de uma curva de calibração utilizando os dados obtidos no presente experimento, calcular as concentrações aproximadas deste metal na água do mar nas quais estes espécimes vivem.

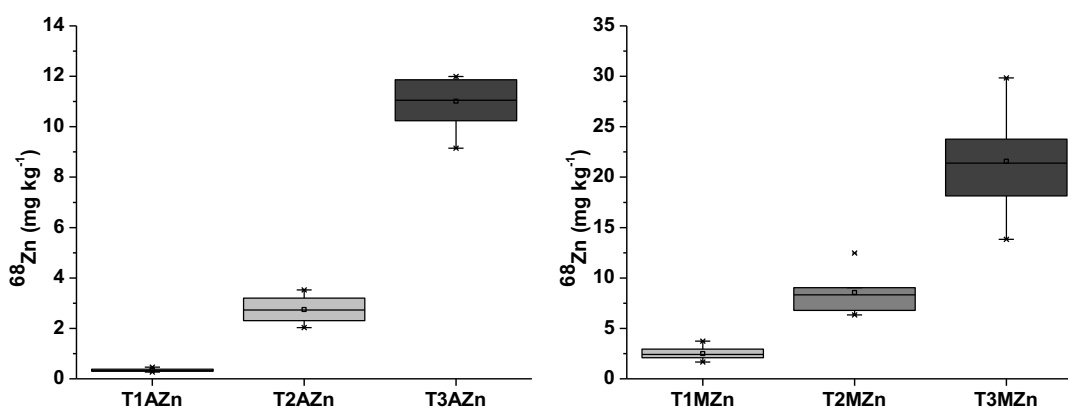


Figura 46 - Concentrações de ^{68}Zn em *B. caissarum* (T1AZn, T2AZn e T3AZn) e *P. perna* (T1MZn, T2MZn e T3MZn). O RSD médio das determinações de Zn nos tecidos dos organismos foi de 0,001%.

7.3.3 Extração de proteínas associadas ao ^{68}Zn

Além da concentração de Zn total, a forma na qual este elemento é bioacumulado é de grande interesse para uma melhor compreensão da acumulação em si e de potenciais mecanismos de detoxificação. Para isso, utilizou-se o mesmo procedimento de extração utilizado para o experimento com o Cd (capítulo anterior). Assim, para a extração de proteínas citosólicas associadas ao Zn, as amostras liofilizadas de *B. caissarum* e *P. perna* foram extraídas utilizando-se uma solução de extração constituída de Tris-HCl (tampão) 10 mM pH 7,4, NaCl 25 mM, PMSF 0,01 mM, 2-ME 5 mM e permaneceram no ultrassom por 4h a 38°C.

Berthet et al. (2005) observou um aumento nas concentrações de Zn na fração solúvel de tecidos de esponjas *Spongia officinalis* com o aumento das concentrações de exposição. Nestas esponjas aproximadamente 50% do Zn total estava presente no citosol.

7.3.4 Especificação de Zn em *B. caissarum* e *P. perna*

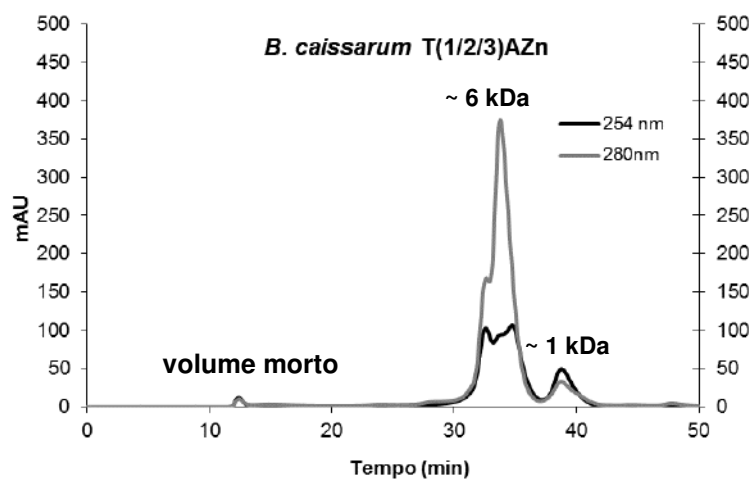
Os extratos de *B. caissarum* e *P. perna* obtidos foram posteriormente analisados por SEC-UV/Vis e SEC-ICP-MS para o monitoramento do Zn. De modo a monitorar a fração orgânica (NG et al., 2007) os comprimentos de onda de 254 e 280 nm foram selecionados, como mostra a Figura 47 para as três diferentes amostras. A Figura 48 apresenta os cromatogramas correspondentes com detecção por ICP-MS.

Ng et al. (2007) definiram para mexilhões *P. viridis* as frações com tamanho molecular >20.000 Da como PAPM, entre 7.000 e 20.000 Da como PSMT e <7.000 Da PBPM. Considerando esta definição, as frações das amostras foram classificadas de acordo com o peso molecular aproximado obtido por SEC. As PSMTs foram consideradas até aproximadamente 5 kDa, pois em estudos anteriores encontrou-se PSMTs menores que 7 kDa, como para a esponja *Spongia officinalis* (BERTHET et al., 2005). Alguns autores identificaram que o uso de procedimentos para isolar as MTs, principalmente o uso de mercaptoetanol pela sua função de proteção da estrutura de MTs, pode explicar pequenas diferenças no peso molecular encontrado (BRAGIGAND; BERTHET, 2003). Pode ser observado pelos cromatogramas SEC-UV/Vis e SEC-ICP-MS nas Figuras 47e 48 que as proteínas citosólicas de *B.*

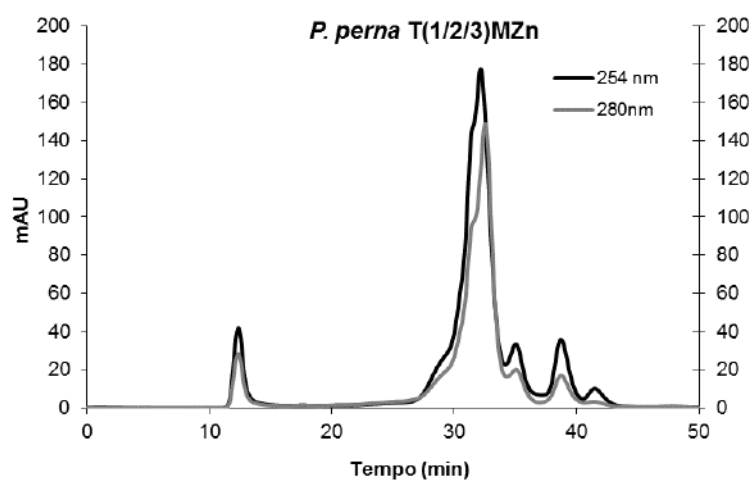
caissarum apresentaram PAPMs (pico 1 de T1AZn, T2AZn e T3AZn), PSMTs (pico 2 de T1AZn e T2AZn e a fração complexa contendo uma mistura de espécies em T3AZn) ligadas ao ^{68}Zn . A amostra de secreção mucosa de *B. caissarum* (Muco T3AZn) apresentou PSMT e PBPM ligadas ao ^{68}Zn . As frações citosólicas observadas para *P. perna* não apresentaram um padrão bem definido, nos cromatogramas observou-se a presença de frações de PAPMs (volume morto da coluna SEC-200) e frações de PSMTs associadas ao ^{68}Zn .

Marie et al. (2006a) realizaram um transplante dos bivalves de água doce *Corbicula flumínea* e *Dreissena polymorpha* para 4 estações com um gradiente de contaminação por Cd e Zn. Os autores notaram que *C. flumínea* somente apresentou concentrações de MTs correlacionadas com a acumulação de Cd. Já *D. polymorpha* apresentou correlações positivas para ambos os metais. Entretanto, Marie et al. (2006b) observaram a falta de genes de indução de MTs em *D. polymorpha* após experimento de exposição somente ao Zn. Berthet et al. (2005) demonstrou a presença de compostos tiólicos (SH) entre 3 e 15 kDa associados a Ag, Cu e Zn nos tecidos da esponja *Spongia officinalis*. Os autores encontraram uma correlação positiva significativa entre PSMTs e a concentração de metais para Cu, Hg e Zn nesta espécie. Neste experimento, o Zn se mostrou presente principalmente nas frações de PAPMs e PBPMs (<3 kDa).

a)



b)



c)

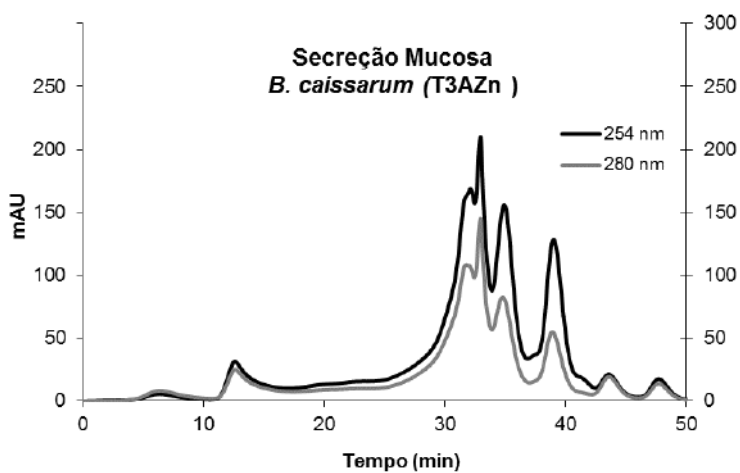


Figura 47 - Cromatogramas SEC-UV/Vis de extratos (a) *B. caissarum* (T(1/2/3)AZn – tratamentos 1, 2 e 3). (b) *P. perna* (T(1/2/3)MCd- tratamentos 1, 2 e 3) e (c) secreção mucosa de *B. caissarum*.

A estabilidade de complexos Zn-proteína é menor que, por exemplo, de complexos Cd-proteína e Hg-proteína. O Zn forma complexos muito lábeis. Por este motivo, os cromatogramas SEC-ICP-MS das amostras de tecido de *P. perna* da incubação com ^{68}Zn não apresentaram padrões estáveis como foi observado para o experimento com ^{116}Cd . Desta forma, a discussão dos resultados é mais complexa, devido à falta de estabilidade. Para os cromatogramas de *B. caissarum* foi observado uma maior estabilidade (Figuras 48b, 48c e 48d). Na Figura 48d, de amostras de tecido de *B. caissarum* do tratamento T3AZn, no qual houve adição de maiores concentrações do *spike* enriquecido em ^{68}Zn , observou-se a formação de uma fração complexa que não ocorreu nos cromatogramas de T1AZn e T2AZn (Figuras 48b e 48c). Esta fração complexa, que eluiu entre aproximadamente 23 e 31 min, indica outra fração com alta afinidade ao Zn. Nesta fração o Zn presente no citosol se associou a componentes (uma mistura de espécies, pois não há picos definidos) desde PAPMs a espécies de ~ 7 kDa. Já para as amostras de muco de *B. caissarum* (Figuras 48e e 48f), os cromatogramas foram bastante instáveis. No entanto, para a amostra de muco de T3AZn (Figura 48f) observa-se um pico a ~ 48 min (<1 kDa) que indica uma fração com alta afinidade ao ^{68}Zn . Já para *P. perna*, como discutido anteriormente, os cromatogramas se mostraram bastante instáveis com associação do Zn a PAPMs. As amostras de T1MZn e T2MZn (Figuras 48h e 48i) apresentaram um pico a ~ 28 min de espécies de aproximadamente 20 kDa (PSMT) com afinidade ao Zn. Somente o cromatograma das amostras T3AZn (Figura 48j), no qual houve adição de maiores concentrações do *spike* enriquecido em ^{68}Zn , pôde-se observar a formação de uma fração complexa entre aproximadamente 23 e 31 min (uma mistura de espécies, pois não há picos definidos, que compreende espécies desde PAPMs a espécies de ~ 7 kDa) que demonstra a presença de frações com alta afinidade ao ^{68}Zn . Esta fração complexa é muito similar à encontrada para *B. caissarum*.

O modelo de Roesijadi (1996) propôs que o Zn é um indutor de MTs primário e que outros elementos, como o Cd, Cu e Hg, os quais apresentam maior afinidade por MTs, substituiriam o Zn, o qual estaria disponível para iniciar uma nova indução de MT. Este modelo demonstra o caráter temporário do Zn associado a MTs ou PSMTs. Esta instabilidade dos complexos Zn-proteína pode dificultar a análise de proteínas associadas ao Zn. Porém, a instabilidade de alguns cromatogramas SEC-ICP-MS obtidos, atesta o caráter lábil dos complexos formados, o que está em

concordância com a teoria de que as MTs ou PSMTs estocam o Zn (homeostase) para uma futura síntese de metaloenzimas e outras demandas metabólicas e/ou têm uma função de detoxificação através da complexação de metais tóxicos que substituiriam o Zn nesta metaloproteínas.

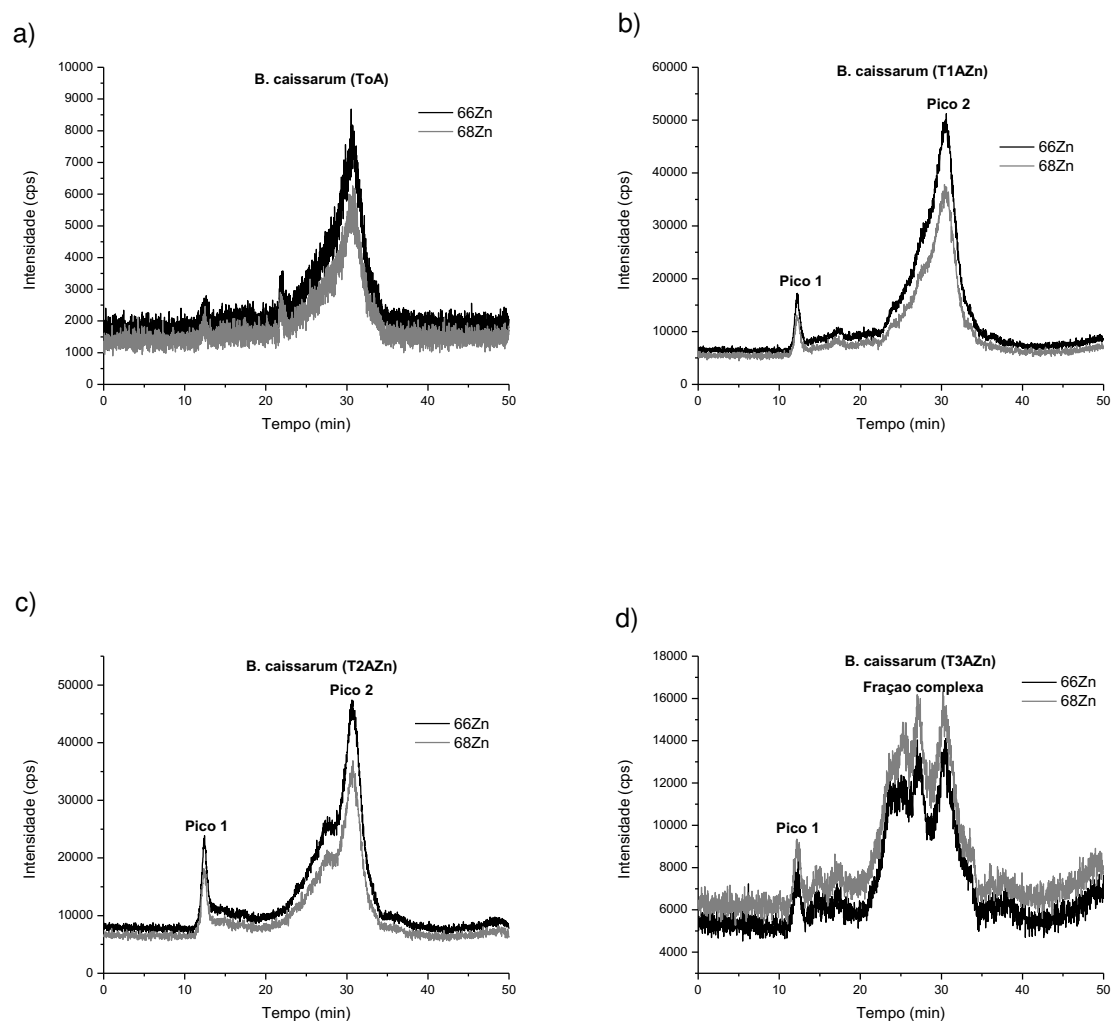


Figura 48 - Cromatogramas SEC-ICP-MS de extratos de (a) *B. caissarum* (ToA - controle), (b) *B. caissarum* (T1AZn - tratamento 1), (c) *B. caissarum* (T2AZn - tratamento 2) e (d) *B. caissarum* (T3AZn - tratamento 3).

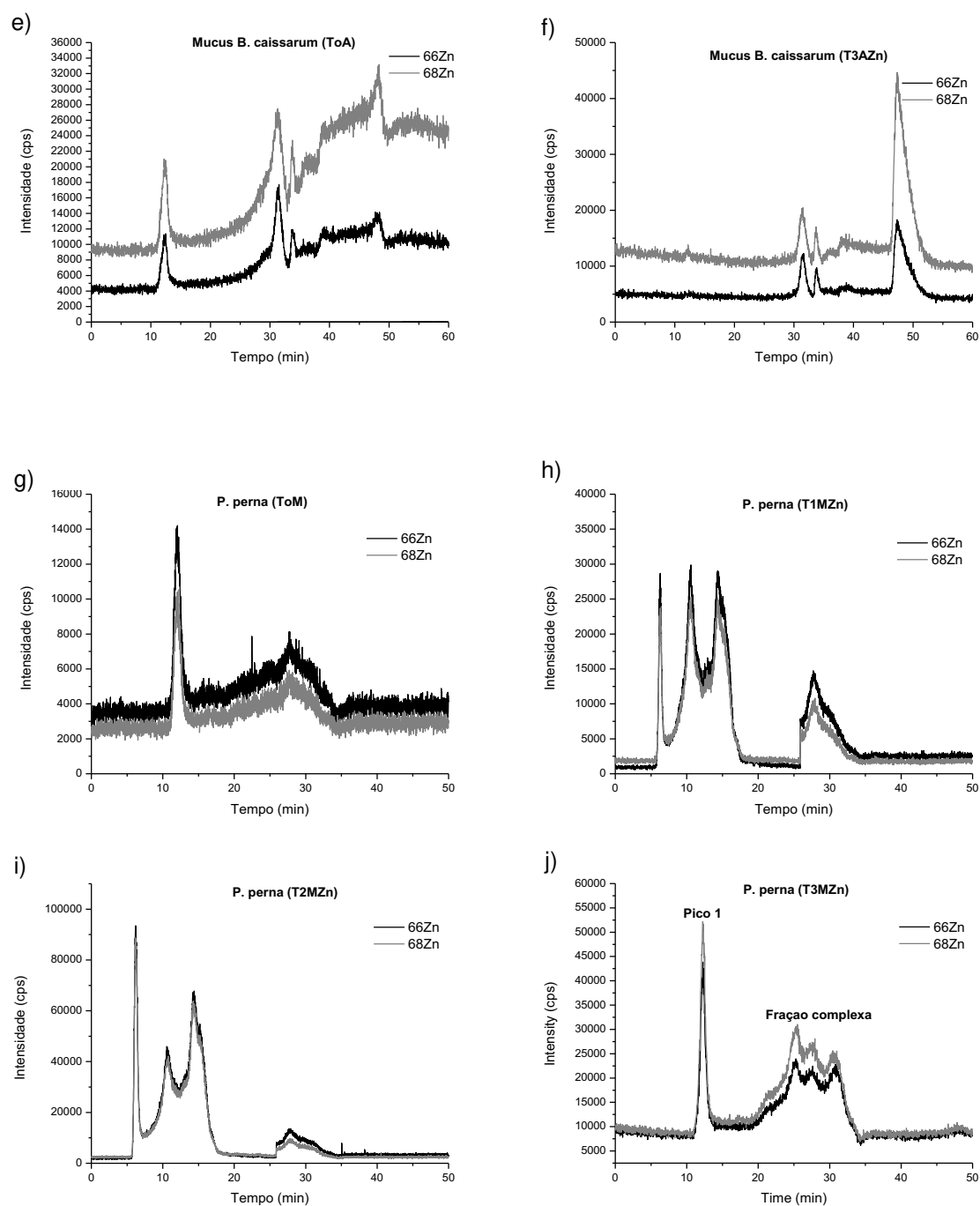


Figura 49 - Cromatogramas SEC-ICP-MS de extratos de (e) secreção mucosa de *B. caissarum* (ToA – controle), (f) secreção mucosa de *B. caissarum* (T3AZn - tratamento 3), (g) *P. perna* (ToM- controle), (h) *P. perna* (T1MZn- tratamento 1), (i) *P. perna* (T2MZn- tratamento 2) e (j) *P. perna* (T3MZn- tratamento 3).

7.3.5 Identificação de proteínas através da análise ESI-MS/MS

As frações purificadas separadas por SEC foram analisadas por ESI-MS/MS com a finalidade de se identificar potenciais proteínas e peptídeos como parceiros de ligação com o Zn. Utilizou-se a digestão enzimática e a análise ESI-MS/MS com a finalidade de identificar metaloproteínas conhecidas ou desconhecidas com potencial afinidade ao Zn, da mesma forma em que foi realizado para as amostras incubadas com Cd. O mapeamento dos peptídeos gerados pela digestão enzimática das proteínas ligadas ao Zn foi estudado nos extratos dos tecidos de *B. Caissarum* e *P. perna*. Devido às baixas concentrações das frações isoladas somente foi possível a obtenção de concentrações suficientes de peptídeos para as amostras da fração de PSMTs de *P. perna* (T3MZn). Além disso, deve-se considerar que estas bases de dados apresentam poucos dados a respeito das espécies estudadas, assim, os peptídeos identificados somente puderam ser combinados com proteínas conhecidas de outros organismos. Por meio da análise de ESI-MS/MS obteve-se uma lista de seis combinações de proteínas (de outros organismos) encontradas na base de dados para as amostras de tecido de *P. perna* (Tabela 11). Nenhuma destas apresenta conhecida afinidade por metais.

Na base de dados *uniprot* encontram-se 42 proteínas sequenciadas para *P. perna*, porém nenhuma MT ou proteína com afinidade a metais. Não foram encontrados até o presente estudos que identificaram MTs ou PSMTs em *P. perna*. Estes dados seriam úteis para auxiliar na compreensão da incorporação de metais por esta espécie, já que está é tradicionalmente utilizada para o biomonitoramento.

Tabela 11 - Proteínas identificadas na fração PSMT das amostras T3MZn

m/z	Peptídeos	Massa (Da)	Nome da proteína	ID Proteína
1221	4 de 9 → 44.4 %	3948	Sweet protein mabinlin-3 chain A	P80352
	5 de 9 → 55.6 %	3976	Sweet protein mabinlin-1 chain A	P80351
	6 de 10 → 60 %	5556	Uncharacterized protein AF_0030	O30205
	2 de 7 → 28.6 %	7446	Gas vesicle structural protein (GPV)	P08412
	3 de 11 → 27.3 %	7673	Uncharacterized protein TP_0132	O83168
	10 de 14 → 71.4 %	7824	40S ribosomal protein S28	Q90YP3

8 CONCLUSÃO

Bunodosoma caissarum mostrou-se um bioacumulador de Hg eficiente. Este apresentou um fator de bioconcentração médio de 70 e reteve de 35 a 70% do Hg anteriormente bioacumulado após uma depuração de 48 dias. Uma vez que o *B. caissarum* manteve uma alta porcentagem do Hg bioacumulado após longo período de depuração, esta espécie poderia ser indicada para o biomonitoramento de locais com concentrações variáveis de Hg e também para avaliar impactos agudos. Em circunstâncias de flutuações das concentrações de Hg no ambiente seria interessante o uso complementar de *B. caissarum* e *P. perna*, o que tornaria o estudo de monitoramento da contaminação por Hg mais robusto.

A presença de *B. caissarum* resultou em uma maior volatilização de Hg. Esta alta volatilização é possivelmente o resultado de reações mediadas por microrganismos associados aos seus tecidos e secreções mucosas.

Em ambos os microcosmos, foi observada a formação de MeHg. Foram detectados níveis mais altos de MeHg na água do mar dos microcosmos sem *B. caissarum*. O motivo para tal pode ser que, sob estas condições, os microrganismos puderam crescer e contribuir para a produção de MeHg sem a interferência da bioacumulação de Hg por parte de *B. caissarum*. Outra possibilidade é que *B. caissarum* tenha incorporado rapidamente parte do MeHg produzido. O Hg estava provavelmente menos disponível para metilação em microcosmos com *B. caissarum* por causa da bioacumulação e devido às altas concentrações de material particulado em suspensão, o qual pode formar complexos com o Hg. Este experimento demonstrou a formação de MeHg na água do mar de microcosmos sem *B. caissarum*. Entretanto, é importante notar que, nos microcosmos contendo *B. caissarum*, este experimento não permite concluir se o MeHg foi formado nos próprios espécimes, na água do mar, ou nas secreções mucosas e, em seguida, acumulado por *B. caissarum*. Ainda há muito a ser elucidado sobre a produção de MeHg em ambientes marinhos óxicos. O mesmo pode ser apontado sobre o papel de microrganismos associados à fauna marinha na ciclagem e especiação de Hg.

Nos experimentos de incubação realizados com ^{116}Cd enriquecido, este isótopo foi acompanhado por análises de ICP-MS. Os espécimes de *Bunodosoma caissarum* alcançaram um FBC médio de 80,5 quando expostos a $0,9 \mu\text{g L}^{-1}$ de ^{116}Cd ,

demonstrando ser eficientes bioacumuladores de Cd. Quanto aos mexilhões *Perna perna*, os espécimes incubados expostos a $0,9 \mu\text{g L}^{-1}$ e $4,5 \mu\text{g L}^{-1}$ de ^{116}Cd apresentaram um FBC médio de respectivamente 850 e 530, demonstrando grande capacidade de bioacumulação de Cd. Ambas as espécies foram capazes de acumular ^{116}Cd em seus tecidos e mostraram-se eficientes bioacumuladores de Cd, porém, em níveis distintos devido às diferentes fisiologias que estas possuem. Através de análises utilizando SEC-ICP-MS diversas frações associadas ao ^{116}Cd puderam ser detectadas, desde espécies de alto peso molecular a espécies de baixo peso molecular. É interessante observar que a distribuição de ^{116}Cd na secreção mucosa foi claramente diferente dos tecidos de *B. Caissarum*, o que possivelmente pode ser explicado como um mecanismo de defesa para a excreção de Cd. Comparando-se as razões isotópicas de $^{114}\text{Cd}/^{116}\text{Cd}$ obtidas, pode-se concluir que *P. perna* e *B. caissarum* bioacumularam o ^{116}Cd com padrões diferentes.

Encontrou-se, por meio da análise de ESI-MS/MS, quatro possíveis combinações de proteínas na base de dados do programa *SwissProt* para as amostras de extratos de tecido de *B. caissarum* associadas ao ^{116}Cd . Duas destas proteínas, a Metalotioneína-A (Q26497) e a Metalotioneína-B (Q26496), apresentam alta afinidade a metais e são encontradas em ouriços-do-mar da espécie *Sphaerechinus granularis*. Estes resultados indicam que as metalotioneínas provavelmente desempenham um papel fundamental na incorporação e rota metabólica do Cd em *B. caissarum*, porém infelizmente não puderam ser identificadas metaloproteínas inteiras neste estudo. Não foram encontrados até o presente estudos sobre MTs ou PSMTs em *B. caissarum*. Assim, estes dados podem auxiliar na compreensão da incorporação de Cd por *B. caissarum* e talvez por outras espécies de anêmonas-do-mar. Ademais, futuros trabalhos devem ser realizados para se tentar identificar proteínas ligadas ao Cd em tecidos de *B. caissarum* e *P. perna*.

Nos experimentos de incubação realizados com ^{68}Zn enriquecido observou-se que a acumulação deste isótopo nos tecidos de *B. caissarum* e *P. Perna* refletiu fortemente o aumento do gradiente de concentração ao qual os espécimes foram expostos nas incubações. Os espécimes de *B. caissarum* alcançaram FBCs médios de 243, 398 e 340 quando expostos a respectivamente $1,4 \mu\text{g L}^{-1}$, $6,9 \mu\text{g L}^{-1}$ e $34,7 \mu\text{g L}^{-1}$ de ^{68}Zn . Quanto aos mexilhões *P. perna*, os espécimes incubados expostos a $1,4 \mu\text{g L}^{-1}$, $6,9 \mu\text{g L}^{-1}$ e $34,7 \mu\text{g L}^{-1}$ de ^{68}Zn apresentaram FBCs médios de 1789, 1238 e

621, respectivamente. Ambas as espécies foram capazes de acumular ^{68}Zn em seus tecidos e mostraram ser bioacumuladores de Zn eficientes. O bivalve filtrador *P. perna*, assim como observado no experimento com Cd, incorporou quantidades superiores de Zn isotopicamente enriquecido. Porém, no experimento com ^{68}Zn pôde-se observar que a diferença entre as concentrações nos tecidos das duas espécies foi menor, especialmente para concentrações de exposição mais altas. Desta forma, pode-se concluir que com concentrações crescentes de exposição a Zn *P. perna* e *B. caissarum* tendem a acumular níveis de Zn cada vez mais próximos. Através de análises em extratos citosólicos dos tecidos de espécimes utilizando SEC-ICP-MS diversas frações associadas ao ^{68}Zn puderam ser detectadas, desde espécies de alto peso molecular a espécies de aproximadamente 7 kDa. Também foi possível observar que a distribuição de ^{68}Zn na fração citosólica da secreção mucosa foi diferente dos tecidos de *B. Caissarum*, podendo este ser um mecanismo de defesa para a excreção de Zn em excesso.

Para as amostras de extratos de tecido de *P. perna* associadas ao ^{68}Zn encontrou-se, por meio da análise de ESI-MS/MS, seis possíveis combinações de proteínas na base de dados do programa *SwissProt*. Nenhuma destas proteínas apresenta conhecida afinidade por metais. Não foram encontrados até o presente estudos que identificaram MTs ou PSMTs em *P. perna* ou *B. caissarum* associadas ao Zn. Assim, futuros trabalhos devem ser realizados na tentativa de se identificar proteínas ligadas ao Zn em tecidos destas espécies.

Bunodosoma caissarum apresenta uma distribuição mais ampla na Baía de Guanabara e parece ser mais tolerante a condições de baixa qualidade ambiental do que *Perna perna*. As concentrações de metais encontradas mostraram-se, em geral, maiores em *Perna perna*, exceto para o arsênio e o bário. As concentrações nas espécies estudadas em geral não são similares devido às diferentes fisiologias e hábitos alimentares que estas possuem. No entanto, as concentrações de Al, Cu, Fe e Ti não apresentaram diferenças significativas entre as duas espécies na amostragem de 2009. Além de para a amostragem de 2013 as concentrações de Ba, Fe e Zn não terem apresentado evidência estatística de diferença entre as espécies. Somente o comportamento do Fe foi similar para *B. caissarum* e *P. perna* nas duas amostragens.

Inicialmente escolhido como área controle para a amostragem de 2009, o setor insular adjacente à Baía de Guanabara não apresentou características de uma área com pouca influência antrópica. Pelo contrário, em algumas situações, tanto na amostragem de 2009 quanto na de 2013, foram encontradas concentrações de metais maiores ou próximas às encontradas no setor interno da baía, considerado mais contaminado por metais do que a região insular adjacente. Estas concentrações de metais encontradas para o setor externo da Baía de Guanabara sugerem que a influência da baía atinge uma área maior do litoral do que costuma ser considerado. Estas podem estar relacionadas a processos naturais, como as características físico-químicas da água, que influenciam a biodisponibilidade dos elementos, e as águas de ressurgência que podem chegar a estes locais. Porém, podem também estar relacionadas às atividades antrópicas, como a remobilização de metais provocada pela disposição de material dragado, a influência dos efluentes lançados pelos emissários submarinos de Ipanema e da Barra da Tijuca ou a exportação das águas da Baía de Guanabara para esta região.

O setor de entrada e o setor interno da Baía de Guanabara apresentaram, em geral, concentrações mais altas de Al, Cu, Cr, Fe, Mn, Ni, Pb, Sn e Zn do que o setor externo da baía. Já o setor externo da Baía de Guanabara apresentou concentrações mais altas de Cd do que o setor interno e o setor de entrada da baía. Somente para *P. perna* as concentrações de As e V foram mais elevadas no setor externo do que nas outras áreas da Baía de Guanabara e somente para *B. caissarum* Ba foi mais alto no setor externo do que nas outras áreas da Baía de Guanabara, principalmente para a amostragem de 2009. Foi observado que os padrões de distribuição de metais na área de estudo se dividem em dois grupos principais, o setor insular adjacente à baía, o qual não apresenta similaridade com os outros setores, e os setores interno e de entrada da baía, os quais apresentaram maior similaridade.

A anêmona-do-mar *B. caissarum* pode ser utilizada como uma espécie biomonitora da contaminação por metais, já que foi capaz de acumular todos os metais em seus tecidos e apresentou uma distribuição abrangente na área de estudo. Estudos de incubações, como os de Cd, Hg e Zn realizados no presente estudo, possibilitam a compreensão das características de bioacumulação de cada metal por *B. caissarum* e *P. perna* e fornecem subsídios para o uso destas espécies em biomonitoramentos. *B. caissarum* apresenta grande potencial para complementar

estudos de biomonitoramento nos quais se utiliza outras espécies, como o molusco *P. perna*. Isto porque, cada espécie responde às flutuações das concentrações no ambiente de forma diferente, como observado para o Hg por exemplo. *B. caissarum*, por ser abundante em diversas regiões brasileiras e por ter se mostrado tolerante à diversas condições ambientais, pode ser muito útil para estudos de monitoramento da contaminação ambiental a nível nacional se melhor estudada e pode complementar o biomonitoramento de áreas nas quais já é implementado o uso de outra espécie monitora.

9 RECOMENDAÇÕES FINAIS

- Recomenda-se que *Bunodosoma caissarum* seja estudada como espécie biomonitora para outras áreas de estudo.
- Realizar outros experimentos de incubação com outros metais e também com compostos orgânicos em microcosmos com *Bunodosoma caissarum*.
- Investigar os microorganismos associados aos tecidos e secreções mucosas de *B. caissarum* em estudos de microcosmos.
- Estudar a incorporação de metais em *B. caissarum* por meio da alimentação.
- Investigar a possibilidade das secreções mucosas serem uma forma de detoxificação para *B. caissarum*.
- Identificar metaloproteínas em *Bunodosoma caissarum* e *Perna perna*.

10 REFERÊNCIAS

ALLARD, B.; ARSENIE, I. Abiotic reduction of mercury by humic substances in aquatic system - an important process for the mercury cycle. **Water Air Soil Pollut.** v. 56, p. 457-464, 1991.

AMADO, E. M. **Adaptação de anêmonas do mar a variação de salinidade – evidências de mecanismos regulatórios.** Paraná, 2006. 63 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Biologia Celular (Fisiologia), Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2006.

AMADO, E. M.; VIDOLIN, D.; FREIRE, C. A.; SOUZA, M. M. Distinct patterns of water and osmolyte control between intertidal (*Bunodosoma caissarum*) and subtidal (*Anemonia sargassensis*) sea anemones. **Comp. Biochem. Phys., A.** 158, p. 542-551, 2011.

AMIARD, J. C.; AMIARD-TRIQUET, C.; BERTHET, B.; METAYER, C. Comparative study of the patterns of bioaccumulation of essential (Cu, Zn) and non-essential (Cd, Pb) trace metals in various estuarine and coastal organisms. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 106, p. 73-89, 1987.

AMIARD, J. C.; AMIARD-TRIQUET, C.; BARKA, S.; PELLERIN, J.; RAINBOW, P. S. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. **Aquat. Toxicol.**, v. 76, p. 160-202, 2006.

ANANDRAJ, A.; MARSHALL, D. J.; GREGORY, M. A.; MCCLURG, T. P. Metal accumulation, filtration and O₂ uptake rates in the mussel *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia) exposed to Hg²⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺. **Comp. Biochem. Phys. C.**, v. 132, p. 355-363, 2002.

AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. **Metais:** gerenciamento da toxicidade. São Paulo: Editora Atheneu, 2003. 554 p.

BABIARZ, C. L.; HURLEY, J. P.; KRABBENHOFT, D. P.; GILMOUR, C.; BRANFIREUN, B. A. Application of ultrafiltration and stable isotopic amendments to field studies of mercury partitioning to filterable carbon in lake water and overland runoff. **Sci. Total Environ.**, v. 304, p. 295-303, 2003.

BAPTISTA NETO, J. A.; CRAPEZ, M.; MCALISTER, J. J.; VILELA, C. G. Concentration and bioavailability of heavy metals in sediments from Niterói Harbour (Guanabara Bay/S.E. Brazil). **Journal of Coastal Research**, v. 21, n. 4, p. 811-817, 2005.

BAPTISTA NETO, J. A.; GINGELE, F. X.; LEIPE, T.; BREHME, I. Spatial distribution of heavy metals in surficial sediments from Guanabara Bay: Rio de Janeiro. **Brazil. Environ. Geol.**, v. 49, p. 1051-1063, 2006.

BAPTISTA NETO, J. A.; WALLNER-KERSANACH, M.; PATCHINEELAM, S. M. **Poluição marinha**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. 412 p.

BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados**. 4. ed. São Paulo: Ed. Roca, 1990. 1179 p.

BARNES, R. D. Cnidários. In: _____. **Zoologia dos invertebrados**. 4. ed. São Paulo: Ed. Roca, 1990. p. 160-168.

BATISTA, D. **Potencial das esponjas marinhas (Filo Porífera) como biomonitoras de poluição no litoral do Rio de Janeiro, RJ, Brasil**. Rio de Janeiro, 2010. 203 f. Tese (Doutorado) – Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas, Departamento de Invertebrados – Museu Nacional - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

BATISTA, D. Marine sponges with contrasting life histories can be complementary biomonitors of heavy metal pollution in coastal ecosystems. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, v. 21, p. 5785-5794, 2014.

BATTKE, F.; ERNST, D.; FLEISCHMANN, F.; HALBACH, S. Phytoreduction and volatilization of mercury by ascorbate in *Arabidopsis thaliana*, European beech and Norway spruce. **Appl. Geochem.**, v. 23, p. 494-502, 2008.

BEBIANNO, M. J.; MACHADO, L. M. Concentrations of metals and metallothioneins in *Mytilus galloprovincialis* along the south coast of Portugal. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 34, p. 666-671, 1997.

BELÉM, M. J. C. Anatomy and biology of *Bunodosoma caissarum* Corrêa, 1964 (Cnidaria, Anthozoa, Actiniidae): 1. Systematic position and revision of morphology and microanatomy. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 60, p. 365-375, 1988.

BELLOTO, V. R.; FRANCIONI, E. Níveis de metais e suas aplicações na análise e monitoramento ambiental marinho. In: RESGALLA JR., C.; WEBER, L. I.; CONCEIÇÃO, M. B. **O mexilhão *Perna perna* (L.):** biologia, ecologia e aplicações. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. cap. 13.

BÉRGAMO, A. L. **Características hidrográficas da circulação e dos transportes de volume e sal na Baía de Guanabara (RJ):** variações sazonais e moduladas pela maré. São Paulo, 2006. 200 f. Tese (Doutorado) – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

BERTHET, B.; MOUNEYRAC, C.; PÉREZ, T.; AMIARD-TRIQUET, C. Metallothionein concentration in sponges (*Spongia officinalis*) as a biomarker of metal contamination. **Comp. Biochem. Phys. C.**, v. 141, p. 306-313, 2005.

BIAGIOLI, M.; PIFFERI, S.; RAGGHIANI, M.; BUCCI, S.; RIZZUTO, R.; PINTON, P. Endoplasmic reticulum stress and alteration in calcium homeostasis are involved in cadmium-induced apoptosis. **Cell Calcium**, v. 43, p. 184-195, 2008.

BLACKMORE, G.; WANG, W. X. Relationships between metallothioneins and metal accumulation in the whelk *Thais clavigera*. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 277, p. 135-145, 2004.

BOWEN, H. J. M. **Environmental Chemistry of the Elements**. Londres: Academic Press, 1979. 333 p.

BRAGIGAND, V.; BERTHET, B. Some methodological aspects of metallothionein evaluation. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 134A, p. 55-61, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998. **Princípios gerais para o estabelecimento de níveis máximos de contaminantes químicos em alimentos**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/685_98.htm>. Acesso em: 13 jan. 2011.

BROWNLOW, A. H. **Geochemistry**. 2. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1996. 580 p.

BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G. J. **Invertebrates**. 2. ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 2003. 936 p.

CADORE, S.; MATOSO, E.; SANTOS, M. C. A espectrometria atômica e a determinação de elementos metálico em material polimérico. **Quim. Nova**, v. 31, n. 4, p. 1533-1542, 2008.

CANTILLO, A. Y. Comparison of results of Mussel Watch Programs of the United States and France with worldwide Mussel Watch studies. **Marine Pollution Bulletin**, v. 36, n. 9, p. 712-717, 1998.

CARREIRA, R. S.; WAGENER, A. L. R. Speciation of sewage derived phosphorus in coastal sediments from Rio de Janeiro, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 36, n. 10, p. 818-827, 1998.

CARREIRA, R. S.; WAGENER, A. L. R.; READMAN, J. W.; FILEMAN, T. W.; MACKO, S. A.; VEIGA, A. Changes in sedimentary organic carbon pool of a fertilized tropical estuary, Guanabara Bay, Brazil: an elemental, isotopic and molecular marker approach. **Marine Chemistry**, v. 79, p. 207-227, 2002.

CARREIRA, R. S.; WAGENER, A. L. R.; READMAN, J. W. Sterols as markers of sewage contamination in a tropical urban estuary (Guanabara Bay, Brazil): space-time variations. **Estuar. Coast. Shelf S.**, v. 60, p. 587-598, 2004.

CARVALHO, C. E. V.; LACERDA, L. D.; GOMES, M. P. Heavy metal contamination of the marine biota along the Rio de Janeiro coast, SE-Brazil. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 57, p. 645-653, 1991.

CARVALHO, C. E. V.; LACERDA, L. D. Heavy metals in the Guanabara Bay biota: Why such low concentrations? **Ciência e Cultura**, v. 44, n. 213, p. 184-186, 1992.

CARVALHO, C. E. V.; CAVALCANTE, M. P. O.; GOMES, M. P.; FARIA, V. V.; REZENDE, C. E. Distribuição de metais pesados em mexilhões (*Perna perna* L.) da Ilha de Santana, Macaé, SE, Brasil. **Ecotoxicology and Environmental Restoration**, v. 4, n. 1, p. 1-5, 2001.

CELO, V.; LEAN, D. R. S.; SCOTT, S. L. Abiotic methylation of mercury in the aquatic environment. **Sci. Total Environ.**, v. 368, p. 126-137, 2006.

CHASIN, A. A. M.; CARDOSO, L. M. N. Cádmiu. In: AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. **Metais: gerenciamento da toxicidade**. São Paulo: Editora Atheneu, 2003. p.263-298.

CHOI, S. C.; BARTHA, R. Environmental factors affecting mercury methylation in estuarine Sediments. **B. Environ. Contam. Tox.**, v. 53, n. 6, p. 805-812, 1994.

CLARK, R. B. **Marine Pollution**. 3. ed. New York: Oxford University Press, 1996. 172 p.

COELHO, V. **Baía de Guanabara**: uma história de agressão ambiental. Rio de Janeiro: Casa da Palavra, 2007. 278 p.

COIMBRA, J.; CARRAÇA, S. Accumulation of Fe, Zn, Cu and Cd during the different stages of the reproductive cycle in *Mytilus Edulis*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 95C, n. 2, p. 265-270, 1990.

COMANS, R. N. J.; VAN DIJK, C. P. J. Role of complexation processes in cadmium mobilization during estuarine mixing. **Nature**, v. 336, n. 6195, p. 151-154, 1988.

CONAWAY, C. H.; BLACK, F. J.; GAULT-RINGOLD, M.; PENNINGTON, J. T.; CHAVEZ, F. P.; FLEGAL, A. R. Dimethylmercury in coastal upwelling waters, Monterey Bay, California. **Environ. Sci. Technol.**, v. 43, p. 1305-1309, 2009.

CORDEIRO, L. G. S. M.; CARREIRA, R. S.; WAGENER, A. L. R. Geochemistry of fecal sterols in a contaminated estuary in southeastern Brazil. **Organic Geochemistry**, v. 39, p. 1097-1103, 2008.

CORREIA, R. R. S.; OLIVEIRA, D. C. M.; GUIMARÃES, J. R. D. Total Mercury Distribution and Volatilization in Microcosms with and Without the Aquatic Macrophyte *Eichhornia Crassipes*. **Aquat. Geochem.**, v. 18, p. 421-432, 2012a.

CORREIA, R. R. S.; MIRANDA, M. R.; GUIMARÃES, J. R. D. Mercury Methylation and the microbial consortium in periphyton of tropical macrophytes: Effect of different inhibitors. **Environ. Res.**, v. 112, p. 86-91, 2012b.

COSSA, D. A review of the use of *Mytilus spp.* as quantitative indicators of cadmium and mercury contamination in coastal waters. **Oceanologica Acta**, v. 12, n. 4, p. 417-432, 1989.

COSSA, D.; AVERTY, B.; PIRRONE, N. The origin of methylmercury in open Mediterranean waters. **Limnol. Oceanogr.**, v. 54, p. 837-844, 2009.

COSSA, D.; HEIMBÜRGER, L.-E.; LANNUZEL, D.; RINTOUL, S. R.; BUTLER, E. C. V.; BOWIE, A. R.; AVERTY, B.; WATSON, R. J.; REMENYI, T. Mercury in the Southern Ocean. **Geochim. Cosmochim. Ac.**, v. 75, p. 4037-4052, 2011.

COSTA, M.; PAIVA, E.; MOREIRA, I. Total mercury in *Perna perna* mussels from Guanabara Bay – 10 years later. **Sci. Total Environ.**, v. 261, p. 69-73, 2000.

DEFOREST, D. K.; BRIX, K. V.; ADAMS, W. J. Assessing metal bioaccumulation in aquatic environments: The inverse relationship between bioaccumulation factors, trophic transfer factors and exposure concentration. **Aquat. Toxicol.**, v. 84, p. 236-246, 2007.

DE LUCA REBELLO, A.; HAEKEL, W.; MOREIRA, I.; SANTELLI, R.; SCHROEDER, F. The fate of heavy metals in an estuarine tropical system. **Marine Chemistry**, v. 18, p. 215-225, 1986.

DESROSIERS, M.; PLANAS, D.; MUCCI, A. Mercury methylation in the epilithon of boreal shield aquatic ecosystems. **Environ. Sci. Technol.**, v. 40, p. 1540-154, 2006.

DONAT, J. R.; BRULAND, K. W. Trace elements in the oceans. In: SALBU, B.; STEINNESS, E. (Eds.). **Trace elements in natural waters**. Boca Raton, FL: CRC-Press, 1995. p. 247-281.

DONNICI, S.; SERANDREI-BARBERO, R.; BONARDI, M.; SPERLE, M. Benthic foraminifera as proxies of pollution: The case of Guanabara Bay (Brazil). **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, p. 2015-2028, 2012.

DRISCOLL, C. T.; CHEN, C. Y.; HAMMERSCHMIDT, C. R.; MASON, R. P.; GILMOUR, C. C.; SUDERLAND, E. M.; GREENFIELD, B. K.; BUCKMAN, K. L.; LAMBORG, C. H. Nutrient supply and Mercury dynamics in marine ecosystems: A conceptual model. **Environ. Res.**, v. 119, p. 118-131, 2012.

DURAN, R.; RANCHOU-PEYRUSE, M.; MENUET, V.; MONPERRUS, M.; BAREILLE, G.; GOÑI, M. S.; SALVADO, J. C.; AMOUROUX, D.; GUYONEAUD, R.; DONARD, O. F. X.; CAUMETTE, P. Mercury methylation by a microbial community from sediments of the Adour Estuary (Bay of Biscay, France). **Environ. Pollut.**, v. 156, p. 951-958, 2008.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). Disponível em: <<http://water.epa.gov/drink/contaminants/index.cfm#Inorganic>>. Acesso em: 21 jan. 2015.

FARIAS, C. O.; HAMACHER, C.; WAGENER, A. L. R.; SCOFIELD, A. L. Origin and degradation of hydrocarbons in mangrove sediments (Rio de Janeiro, Brazil) contaminated by an oil spill. **Organic Geochemistry**, v. 39, p. 289-307, 2008.

FERNANDES, F. C.; SOUZA, R. C. C. L.; JUNQUEIRA, A. O. R.; RAPAGNÃ, L. C.; RAMOS, A. B. Distribuição mundial e o impacto de sua introdução no Brasil. In: RESGALLA JR., C.; WEBER, L. I.; CONCEIÇÃO, M. B. **O mexilhão *Perna perna* (L.):** biologia, ecologia e aplicações. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. cap. 2.

FERNANDEZ, M. A. S. **Geoquímica de metais pesados na Região do lagos, RJ:** uma proposta de estudo integrado. Niterói, 1994. 163 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Geoquímica, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 1994.

FERNANDEZ, M. A.; WAGENER, A. L. R.; LIMAVERDE, A. M.; SCOFIELD, A. L.; PINHEIRO, F. M.; RODRIGUES, E. Imposex and surface sediment speciation: a combined approach to evaluate organotin contamination in Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. **Mar. Environ. Res.**, v. 59, p. 435-452, 2005.

FERNANDEZ, M. A.; PINHEIRO, F. M. New approaches for monitoring the marine environment: the case of antifouling paints. **Int. J. Environment and Health**, v. 1, n. 3, p. 427-448, 2007.

FONSECA, E. M.; BAPTISTA NETO, J. A.; CRAPEZ, M. C.; MCALLISTER, J. J.; FERNANDEZ, M. A.; BISPO, M. G. Bioavailability of heavy metals in Guanabara Bay, Rio de Janeiro (Brazil). **Journal of Coastal Research**, Special Issue, v. 56, p. 802-806, 2009.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance Document for Chromium in Shellfish**. Washington, D.C.: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Office of Seafood (HFS-416), 1993. 40 p.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance Document for Nickel in Shellfish**. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Office of Seafood (HFS-416). 1993. 39 p.

FRANCIONI, E. **Avaliação dos registros de cádmio, cobre, cromo e zinco em mexilhões *Perna perna* (Linné, 1758) do litoral do estado do Rio de Janeiro (Brasil)**. Rio de Janeiro, 1997. 154 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1997.

FRANCIONI, E. **Acumulação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e metais traço em invertebrados marinhos e avaliação do uso de biomarcadores celulares e bioquímicos no biomonitoramento**. Rio de Janeiro, 2001. 214 f. Tese (Doutorado) - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

FRANCIONI, E.; WAGENER, A. L. R.; CAMPOS, R. C.; BASTOS, G. C. Evaluation of *Perna perna* (Linné, 1758) as a tool to monitoring trace metals contamination in estuarine and coastal waters of Rio de Janeiro. **Brazil. J. Braz. Chem. Soc.**, v. 15, n.1, p. 103-110, 2004.

GARCIA ALONSO, J. I.; RODRIGUEZ-GONZALEZ, P. **Isotope dilution mass spectrometry**. Cambridge: RSC, 2013. 453 p.

GEFFARD, A.; AMIARD-TRIQUET, C.; AMIARD, J. C. Do seasonal changes affect metallothionein induction by metals in mussels, *Mytilus edulis*? **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 61, p. 209-220, 2005.

GILBERT, A. L.; GUZMÁN, H. M. Bioindication potential of carbonic anhydrase activity in anemones and corals. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 42, n. 9, p. 742-744, 2001.

GILMOUR, C. C.; RIEDEL, G. S. Measurement of Hg methylation in sediments using high specific-activity ²⁰³Hg and ambient incubation. **Water Air Soil Poll.**, v. 80, p. 747-756, 1995.

GODOY, J. M.; MOREIRA, I.; BRAGANÇA, M. J.; WANDERLEY, C.; MENDES, L. B. A study of Guanabara Bay sedimentation rates. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 227, n. 1/2, p. 157-160, 1998.

GOUVEA, R. C. S.; SANTOS, P. L.; GOUVEA, V. A. Contaminação radioativa de *Bunodosoma caissarum* Corrêa, 1964 (Cnidaria, actinidae) sob condições controladas. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 45, n. 1/2, p. 101-104, 1985.

GOUVEA, R. C. S.; SANTOS, P. L.; DUTRA, I. R. Uptake of ²¹⁰Pb and ²¹⁰Po by brazilian *Bunodosoma caissarum* Corrêa, 1964 (Cnidaria, Actinidae). **The Science of the Total Environment**, v. 83, p. 181-183, 1989.

GONZÁLEZ IGLESIAS, H.; FERNÁNDEZ SÁNCHEZ, M. L.; GARCÍA ALONSO, J. I.; SANZ-MEDEL, A. Use of enriched ⁷⁴Se and ⁷⁷Se in combination with isotope pattern deconvolution to differentiate and determine endogenous and supplemented selenium in lactating rats. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 389, p. 707-713, 2007.

GREGORY, M. A.; MARSHALL, D. J.; GEORGE, R. C.; ANANDRAJ, A.; MCCLURG, T. P. Correlations between metal uptake in the soft tissue of *Perna perna* and gill filament pathology after exposure to mercury. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 45, p. 114-125, 2002.

GUIMARÃES, J. R. D.; MALM, O.; PFEIFFER, W. C. A simplified radiochemical technique for measurement of net mercury methylation rates in aquatic systems near goldmining areas, Amazon, Brazil. **Sci. Total Environ.**, v. 172, n. 2, p. 151-162, 1995.

GUIMARÃES, J. R. D.; IKINGURA, J.; AKAJI, H. Methyl mercury production and distribution in river water-sediment systems investigated through radiochemical techniques. **Water Air Soil Poll.**, v. 124, p. 113-124, 2000a.

GUIMARÃES, J. R. D.; ROULET, M.; LUCOTTE, M.; MERGLER, D. Mercury methylation along a lake-forest transect in the Tapajós river floodplain, Brazilian Amazon: seasonal and vertical variations. **Sci. Total Environ.**, v. 261, p. 91-98, 2000b.

HAMELIN, S.; AMYOT, M.; BARKAY, T.; WANG, Y.; PLANAS, D. Methanogens: principal methylators of mercury in lake periphyton. **Environ. Sci. Technol.**, v. 45, p. 7693-7700, 2011.

HAMMERSCHMIDT, C. R.; BOWMAN, K. L. Vertical methylmercury distribution in the subtropical North Pacific Ocean. **Mar. Chem.**, v. 132-133, p. 77-82, 2012.

HARAGUCHI, H. Metallomics as integrated biometal science. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 19, p. 5-14, 2004.

HARLAND, A. D.; NGANRO, N. R. Copper uptake by the sea anemone *Anemonia viridis* and the role of zooxanthellae in metal regulation. **Marine Biology**, v. 104, p. 297-301, 1990.

HEIMBÜRGER, L. E.; COSSA, D.; MARTY, J. C.; MIGON, C.; AVERTY, B.; DUFOUR, A.; RAS, J. Methyl mercury distributions in relation to the presence of nan- and picoplankton in an oceanic water column (Ligurian Sea, North-western Mediterranean). **Geochim. Cosmochim. Ac.**, v. 74, p. 5549-5559, 2010.

HEUMANN, K. G. Isotope dilution mass spectrometry (IDMS) of the elements. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 11, p. 41-67, 1992.

HOLLWEG, T. A.; GILMOUR, C. C.; MASON, R. P. Methylmercury production in sediments of Chesapeake Bay and the mid-Atlantic continental margin. **Mar. Chem.**, v. 114, p. 86-101, 2009.

HORVAT, M.; KOTNIK, J.; FAJON, V.; LOGAR, M.; ZVONARIK, T.; PIRRONE, N. Speciation of mercury in surface and deep-sea waters in the Mediterranean Sea. **Atmos. Environ.**, v. 37, S1, p. 93-108, 2003.

HUGUET, L.; CASTELLE, S.; SCHÄFER, J.; BLANC, G.; MAURY-BRACHET, R.; REYNOUARD, C.; JORAND, F. Mercury methylation rates of biofilm and plankton microorganisms from a hydroelectric reservoir in French Guiana. **Sci. Total Environ.**, v. 408, p. 1338-1348, 2010.

JORGE, L. C.; GARCIA, L. M.; MARTINS, V. B.; KOSAWA, A.; PAULS, E. Interações dos processos sócio-ambientais nas bacias das Enseadas de Icaraí e São Francisco, Niterói (RJ). 2. Organismos aquáticos como bioindicadores da qualidade ambiental com enfoque no mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1798), em Niterói-RJ. **Mundo & Vida**, v. 3, n. 2, 2002.

KALAS, A. F.; CARREIRA, R. S.; MACKO, S. A.; WAGENER, A. L. R. Molecular and isotopic characterization of the particulate organic matter from an eutrophic coastal bay in SE Brazil. **Continental Shelf Research**, v. 29, p. 2293-2302, 2009.

KEHRIG, H. A.; COSTA, M.; MOREIRA, I.; MALM, O. Total and methylmercury in a Brazilian estuary, Rio de Janeiro. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 44, p. 1018-1023, 2002.

KEHRIG, H. A.; PINTO, F. N.; MOREIRA, I.; MALM, O. Heavy metals and methylmercury in a tropical coastal estuary and a mangrove in Brazil. **Organic Geochemistry**, v. 34, p. 661-669, 2003.

KJERFVE, B.; RIBEIRO, C. H. A.; DIAS, G. T. M.; FILIPPO, A. M.; QUARESMA, V. S. Oceanographic characteristics of an impacted coastal bay: Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, Brazil. **Continental Shelf Research**, v. 17, n. 13, p. 1609-1643, 1997.

KORON, N.; BRATKIC, A.; GUEVARA, S. R.; VAHCIC, M.; HORVAT, M. Mercury methylation and reduction potentials in marine water: An improved methodology using ¹⁹⁷Hg radiotracer. **Appl. Radiat. Isotopes**, v. 70, p. 46-50, 2012.

KUTSCHER, D. J.; SANZ-MEDEL, A.; BETTMER, J. Metallomics investigations on potential binding partners of methylmercury in tuna fish muscle tissue using complementary mass spectrometric techniques. **Metallomics**, v. 4, p. 807-813, 2012.

LACERDA, L. D.; PFEIFFER, W. C.; FISZMAN, M. Monitoring of heavy metal pollution through the critical pathways approach: a case study in Sepetiba Bay, Brazil. In: INTERNATIONAL CONFERENCE: HEAVY METALS IN THE ENVIRONMENT, 4., 1983, Heidelberg. **Proceedings...** Edinburgh: Cep Consultants, 1983. v. 2, p. 1258-1261.

LACERDA, L. D.; CARVALHO, C. E. V.; GOMES, M. P. Nota sobre a distribuição de Mn, Zn e Cu em siris da Baía de Sepetiba. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 49, n. 3, p. 847-849, 1989.

LACERDA, L. D.; FERNANDEZ, M. A.; CALAZANS, C. F.; TANIZAKI, K. F. Bioavailability of heavy metals in sediments of two coastal lagoons in Rio de Janeiro, Brazil. **Hydrobiologia**, v. 228, p. 65-70, 1992.

LACERDA, L. D.; WATTS, P. P. R. Behavior of particulate trace metals through the estuarine mixing zone of Sepetiba Bay. In: INTERNATIONAL CONFERENCE: HEAVY METALS IN THE ENVIRONMENT, 1993, Toronto. **Proceedings...** Edinburgh: Cep Consultants, 1993. v. 1, p. 60-63.

LAGE, H.; JABLONSKI, S. Mussel *Perna perna* extraction and commercialization in Guanabara Bay, Brazil. **Atlântica**, Rio Grande, v. 30, n. 2, p. 161-169, 2008.

LAKSHMANAN, P. T.; NAMBISAN, P. N. K. Bioaccumulation and depuration of some trace metals in the mussel, *Perna viridis* (Linnaeus). **B. Environ. Contam. Tox.**, v. 43, p. 131-138, 1989.

LANZILLOTTA, E.; CECCARINI, C.; FERRARA, R. Photo-induced formation of dissolved gaseous mercury in coastal and offshore seawater of the Mediterranean basin. **Sci. Total Environ.**, v. 300, p. 179-187, 2002.

LAVILLA, I.; COSTAS, M.; GIL, S.; CORDERÍ, S.; SÁNCHEZ, G.; BENDICHO, C. Simplified and miniaturized procedure based on ultrasound-assisted cytosol preparation for the determination of Cd and Cu bound to metallothioneins in mussel tissue by ICP-MS. **Talanta**, v. 93, p. 111-116, 2012.

LAWS, E. A. **Aquatic Pollution**. New York: John Wiley & Sons, 1981. 482 p.

LAWS, E. A. Metals. In:_____. **Aquatic Pollution**. New York: John Wiley & Sons, 1981. cap.12, p. 301-369.

LEHNHERR, I.; LOUIS, V. L. St.; HINTELMANN, H.; KIRK, J. L. Methylation of inorganic mercury in polar marine waters. **Nat. Geosci.**, v. 3, p. 298-302, 2011.

LOBEL, P. B. The effect of dithiothreitol on the subcellular distribution of zinc in the cytosol of mussel kidney (*mytilus edulis*): isolation of metallothionein and a unique low molecular weight zinc-binding ligand. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 92C, n. 2, p. 189-192, 1989.

MACALADY, J. L.; MACK, E. E.; NELSON, D. C.; SCOW, K. M. Sediment microbial community structure and mercury methylation in mercury-polluted clear lake, California. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n. 4, p. 1479-1488, 2000.

MACHADO, W.; SILVA-FILHO, E. V.; OLIVEIRA, R. R.; LACERDA, L. D. Trace metal retention in mangrove ecosystems in Guanabara Bay, SE Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, p. 1277-1280, 2002.

MACHADO, W.; CARVALHO, M. F.; SANTELLI, R. E.; MADDOCK, J. E. L. Reactive sulfides relationship with metal in sediments from an eutrophicated estuary in southeastern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 49, p. 89-92, 2004.

MAIA, C. B.; ALMEIDA, A. C. M.; MOREIRA, F. R. Avaliação do teor de chumbo em mexilhões da espécie *Perna perna* na região metropolitana da cidade do Rio de Janeiro. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, v. 1, n. 2, p. 195-198, 2006.

MAIN, W. P. L.; ROSS, C.; BIELMYER, G. K. Copper accumulation and oxidative stress in the sea anemone, *Aiptasia pallida*, after waterborne copper exposure. **Comp. Biochem. Phys. C.**, v. 151, p. 216-221, 2010.

MALAGRINO, W. **Bioacumulação e eliminação de mercúrio (²⁰³Hg) no mexilhão (*Perna perna*, Linné, 1758). Modelo cinético para avaliar o risco de ingestão no homem.** São Paulo, 2003. 85 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas energéticas e nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MALCOLM, E. G.; SCHAEFER, J. K.; EKSTROM, E. B.; TUIT, C. B.; JAYAKUMAR, A.; PARK, H.; WARD, B. B.; MOREL, F. M. M. Mercury methylation in oxygen deficient zones of the oceans: No evidence of predominance of anaerobes. **Mar. Chem.**, v. 122, p. 11-19, 2010.

MANLY, R.; BLUNDELL, S. P.; FIFIELD, F. W.; MCCABE, P. J. Trace metal concentrations in *Mytilus edulis* L. from the Laguna San Rafael, Southern Chile. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 32, n. 5, p. 444-448, 1996.

MARIE, V.; BAUDRIMONT, M.; BOUDOU, A. Cadmium and zinc bioaccumulation and metallothionein response in two freshwater bivalves (*Corbicula fluminea* and

Dreissena polymorpha) transplanted along a polymetallic gradient. **Chemosphere**, v. 65, p. 609-617, 2006a.

MARIE, V.; GONZALEZ, P.; BAUDRIMONT, M.; BOURDINEAUD, J.-P.; BOUDOU, A. Metallothionein response to cadmium and zinc exposures compared in two freshwater bivalves, *Dreissena polymorpha* and *Corbicula fluminea*. **Biometals**, v. 19, n. 4, p. 399-407, 2006b.

MASON, R. P.; ROLFHUS, K. R.; FITZGERALD, W. F. Methylated and elemental mercury cycling in surface and deep ocean waters of the North Atlantic. **Water Air Soil Pollut.**, v. 80, p. 665-677, 1995.

MASON, R. P.; REINFELDER, J. R.; MOREL, F. M. M. Uptake, toxicity, and trophic transfer of mercury in a coastal diatom. **Environ. Sci. Technol.**, v. 30, p. 1835-1845, 1996.

MASON, R. P.; CHOI, A. L.; FITZGERALD, W. F.; HAMMERSCHMIDT, C. R.; LAMBORG, C. H.; SOERENSEN, A. L.; SUNDERLAND, E. M. Mercury biogeochemical cycling in the ocean and policy implications. **Environ. Res.**, v. 119, p. 101-117, 2012.

MAURO, J. B. N.; GUIMARÃES, J. R. D.; HINTELMANN, H.; WATRAS, C. J.; HAACK, E. A.; COELHO-SOUZA, S. A. Mercury methylation in macrophytes, periphyton, and water – comparative studies with stable and radio-mercury additions. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 374, p. 983-989 (Special Issue), 2002.

MEIJA, J.; YANG, L.; CARUSO, J. A.; MESTER, Z. Calculations of double spike isotope dilution results revisited. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 21, p. 1294-1297, 2006.

MERCK. Periodic System of the Elements (PSE). Disponível em: <<http://pse.merck.de/merck.php>>. Acesso em: 30 fev. 2015.

MERRITT, K. A.; AMIRBAHMAN, A. Mercury methylation dynamics in estuarine and coastal marine environments – A critical review. **Earth-Sci. Rev.**, v. 96, p. 54-66, 2009.

MITCHELMORE, C. L.; RINGWOOD, A. H.; WEIS, V. M. Differential accumulation of cadmium and changes in glutathione levels as a function of symbiotic state in the sea anemone *Anthopleura elegantissima*. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 284, p. 71-85, 2003a.

MITCHELMORE, C. L.; VERDE, E. A.; RINGWOOD, A. H.; WEIS, V. M. Differential accumulation of heavy metals in the sea anemone *Anthopleura elegantissima* as a function of symbiotic state. **Aquat. Toxicol.**, v. 64, p. 317-329, 2003b.

MONPERRUS, M.; TESSIER, E.; AMOUROUX, D.; LEYNAERT, A.; HUONNIC, P.; DONARD, O. F. X. Mercury methylation, demethylation, and reduction rates in coastal and marine surface waters of the Mediterranean Sea. **Mar. Chem.**, v. 107, p. 49-63, 2007.

MORAES, F. C.; BERTONCINI, A.; AGUIAR, A. (Orgs.). **História, pesquisa e biodiversidade do Monumento Natural das Ilhas Cagarras**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2013. 299 p. (Série Livros, 48).

MOUNICOU, S.; SZPUNAR, J.; LOBINSKI, R.; ANDREY, D.; BLAKE, C. Bioavailability of cadmium and lead in cocoa: comparison of extraction procedures prior to size-exclusion fast-flow liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection (SEC-ICP-MS). **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 17, p. 880-886, 2002.

NG, T. Y.-T.; WANG, W.-X. Dynamics of metal subcellular distribution and its relationship with metal uptake in marine mussels. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 24, p. 2365-2372, 2005.

NG, T.Y.-T.; RAINBOW, P. S.; AMIARD-TRIQUET, C.; AMIARD, J. C.; WANG, W.-X. Metallothionein turnover, cytosolic distribution and the uptake of Cd by the green mussel *Perna viridis*. **Aquat. Toxicol.**, v. 84, p. 153-161, 2007.

NATIONAL OCEANIC AND ATMOSPHERIC ADMINISTRATION (NOAA). **Technical Memorandum**. International Mussel Watch. Initial Implementation Phase, Final Report. USA: US Department of Commerce, 1995.

OLIVEIRA, J. P. Níquel. In: AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. **Metais: gerenciamento da toxicidade**. São Paulo: Editora Atheneu, 2003. cap. 5, p. 127-142.

OLIVEIRA, J. S.; ZAHARENKO, A. J.; FREITAS, J. C.; KONNO, K.; ANDRADE, S. A.; PORTARO, F. C. V.; RICHARDSON, M.; SANT'ANNA, O. A.; TAMBOURGI, D. V. Caissarolysin I (Bcs I), a new hemolytic toxin from the Brazilian sea anemone *Bunodosoma caissarum*: Purification and biological characterization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1760, p. 453-461, 2006a.

OLIVEIRA, J. S.; ZAHARENKO, A. J.; FERREIRA JR., W. A.; KONNO, K.; SHIDA, C. S.; RICHARDSON, M.; LÚCIO, A. D.; BEIRÃO, P. S. L.; FREITAS, J. C. BcIV, a new paralyzing peptide obtained from the venom of the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. A comparison with the Na⁺ channel toxin BcIII. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1764, p. 1592-1600, 2006b.

OUERDANE, L.; MESTER, Z.; MEIJA, J. General equation for multiple spiking isotope dilution mass spectrometry. **Anal. Chem.**, v. 81, p. 5075-5079, 2009.

PARK, C. J.; YIM, S. A. Determination of nickel in water samples by isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry with sample introduction by carbonyl vapor generation. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 14, p. 1061-1065, 2004.

PEAKALL, D.; BURGUER, J. Methodologies for assessing exposure to metals: speciation, bioavailability of metals, and ecological host factors. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 56, p. 110-121, 2003.

PNUE/FAO/AIEA/COI. **Programmes de surveillance continue des contaminants utilisant des organismes marins**: assurance de la qualité et bonnes pratiques de laboratoire. [S.l.] : PNUE, 1994. 25 p. (Méthodes de reference pour les études de la pollution marine, n. 57).

PERIN, G.; FABRIS, R.; MANENTE, S.; WAGENER, A. R.; HAMACHER, C.; SCOTTO, S. A five-year study on the heavy metal of Guanabara Bay sediments (Rio de Janeiro, Brazil) and evaluation of the metal bioavailability by means of geochemical speciation. **Water Research**, v. 31, n. 12, p. 3017-3028, 1997.

RAINBOW, P. S.; PHILLIPS, D. J. H. Cosmopolitan biomonitors of trace metals. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 26, n. 11, p. 593-601, 1993.

RAINBOW, P. S. Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 31, n. 4/12, p. 183-192, 1995a.

RAINBOW, P. S. Physiology, physicochemistry and metal uptake – a crustacean perspective. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 31, n. 1/3, p. 55-59, 1995b.

RAINBOW, P. S. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? **Environmental Pollution**, v. 120, p. 497-507, 2002.

RESGALLA JR., C. Fisiologia energética. In: RESGALLA JR., C.; WEBER, L. I.; CONCEIÇÃO, M. B. **O mexilhão *Perna perna* (L.)**: biologia, ecologia e aplicações. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. cap. 8.

REZENDE, C. E.; LACERDA, L. D. Metais pesados em mexilhões (*Perna perna* L.) no litoral do Estado do Rio de Janeiro. **Rev. Brasil. Biol.**, v. 46, n. 1, p. 239-247, 1986.

RIBEIRO GUEVARA, S.; ŽIŽEK, S.; REPINC, U.; PÉREZ CATÁN, S.; JAĆIMOVIĆ, R.; HORVAT, M. Novel methodology for the study of mercury methylation and reduction in sediments and water using ^{197}Hg radiotracer. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 387, p. 2185-2197, 2007.

RIBEIRO GUEVARA, S.; QUEIMALIÑOS, C. P.; DIÉGUEZ, M. C.; ARRIBÉRE, M. Methylmercury production in the water column of an ultraoligotrophic lake of Northern Patagonia, Argentina. **Chemosphere**, v. 72, n. 4, p. 578-585, 2008.

RICHARDSON, J. T.; LEI, M.; TURK, B.; FOSTER, K.; TWIGG, M. V. Reduction of Model Steam Reforming Catalysts: NiO / α -Al₂O₃. **Applied catalysis A: General**, n. 110, p. 217-237, 1994.

RIBEIRO GUEVARA, S.; QUEIMALIÑOS, C. P.; DIÉGUEZ, M. C.; ARRIBÉRE, M. Methylmercury production in the water column of an ultraoligotrophic lake of Northern Patagonia, Argentina. **Chemosphere**, v. 72, n. 4, p. 578-585, 2008.

RIZZINI-ANSARI, N. **Avaliação da anêmona *Bunodosoma caissarum* como espécie bioindicadora de contaminação por HgT na Baía de Guanabara: uma comparação com o mexilhão *Perna perna***. Rio de Janeiro, 2009. 46 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Oceanografia) - Faculdade de Oceanografia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

RIZZINI-ANSARI, N. **Comparação da contaminação por metais no setor interno e externo da Baía de Guanabara utilizando *Bunodosoma caissarum* e *Perna perna* como espécies bioindicadoras**. Niterói, 2011. 139 f. Dissertação (Mestrado em Geociências – Geoquímica Ambiental) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2011.

RIZZINI-ANSARI, N.; CORREIA, R. R. S.; FERNANDEZ, M. A.; CORDEIRO, R. C.; GUIMARÃES, J. R. D. Mercury distribution, methylation and volatilization in microcosms with and without the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 92, p. 105-112, 2015.

RODRÍGUEZ-CEA, A.; CAMPA, M. R. F.; ALONSO, J. I. G.; SANZ-MEDEL, A. The use of enriched ¹¹¹Cd as tracer to study de novo cadmium accumulation and quantitative speciation in *Anguilla Anguilla* tissues. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 21, p. 270-278, 2006.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, P.; RODRÍGUEZ-CEA, A.; ALONSO, J. I. G.; SANZ-MEDEL, A. Species-specific isotope dilution analysis and Isotope pattern deconvolution for butyltin compounds metabolism investigations. **Anal. Chem.**, v. 77, p. 7724-7734, 2005.

ROESIJADI, G. Metallothionein and its role in toxic metal regulation. **Comp. Biochem. Physiol. C.**, v. 113, n. 2, p. 117-123, 1996.

RUSSO, C. A. M.; SOLÉ-CAVA, A. M.; THORPE, J. P. Population structure and genetic variation in two tropical sea anemones (Cnidaria, Actinidae) with different reproductive strategies. **Mar. Biol.**, v. 119, p. 267-276, 1994.

SICILIANO, S. D.; O' DRISCOLL, N. J.; TORDON, R.; HILL, J.; BEAUCHAMP, S.; LEA, D. R. Abiotic production of methylmercury by solar radiation. **Environ. Sci. Technol.**, v. 39, p. 1071-1077, 2005.

SILVA, E. S. Zinco. In: AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. **Metais:** gerenciamento da toxicidade. São Paulo: Editora Atheneu, 2003b. cap. 7, p. 187-201.

SIMKISS, K. Lipid solubility of heavy metals in saline solutions. **J. Mar. Biol. Assoc. UK**, v. 63, p. 1-7, 1983.

SISBAHIA (SISTEMA BASE DE HIDRODINÂMICA AMBIENTAL). Disponível em: <<http://www.sisbahia.coppe.ufrj.br/>>. Acesso em: 02 abr. 2015.

SOERENSEN, A. L.; SUNDERLAND, E. M.; HOLMES, C. D.; JACOB, D. L.; YANTOSCA, R. M.; SKOV, H.; CHRISTENSEN, J. H.; STRODE, S. A.; MASON, R. P. An improved global model for air-sea exchange of mercury: high concentrations over the North Atlantic. **Environ. Sci. Technol.**, v. 44, p. 8574-8580, 2010.

SUNDERLAND, E. M.; KRABBENHOFT, D. P.; MOREAU, J. W.; STRODE, S. A.; LANDING, W. M. Mercury sources, distribution, and bioavailability in the North Pacific

Ocean: insights from data and models. **Global Biogeochem. Cy.**, v. 23, GB2010, doi:10.1029/2008GB003425, 2009.

TESSIER, A.; TURNER, D. R. **Metal speciation and bioavailability in aquatic systems**. England: John Wiley & Sons, 1995. 679 p.

TESSIER, E.; MARTIN-DOIMEADIOS, R. C. R.; AMOUROUX, D.; MORIN, A.; LEHNHOFF, C.; THYBAUD, E.; VINDIMIAN, E.; DONARD, O. F. X. Time course transformations and fate of mercury in aquatic model ecosystems. **Water Air Soil Pollut.**, v. 183, p. 265-281, 2007.

THÉBAULT, H.; BAENA, A. M. R.; ANDRAL, B.; BARISIC, D.; ALBALADEJO, J. B.; BOLOGA, A. S.; BOUDJENOUN, R.; DELFANTI, R.; EGOROV, V. N.; KHOUKHI, T. E.; FLOUROU, H.; KNIEWALD, G.; NOUREDDINE, A.; PATRASCU, V.; PHAM, M. K.; SCARPATO, A.; STOKOZOV, N. A.; TOPCUOGLU, S.; WARNAU, M. ¹³⁷Cs baseline levels in the Mediterranean and Black Sea: A cross-basin survey of the CIEM Mediterranean Mussel Watch programme. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 57, p. 801-806, 2008.

TSENG, C. M.; AMOUROUX, D.; ABRIL, G.; TESSIER, E.; ETCHEBER, H.; DONARD, O. F. X. Speciation of mercury in a fluid mud profile of a highly turbid macrotidal estuary (Gironde, France). **Environ. Sci. Technol.**, v. 35, p. 2627-2633, 2001.

ULLRICH, S. M.; TANTON, T. W.; ABDRAHITOVA, S. A. Mercury in the aquatic environment: a review of factors affecting methylation. Crit. Rev. **Environ. Sci. Tech.**, v. 31, p. 241-293, 2001.

VASAK, M. Metal removal and substitution in vertebrate and invertebrate metallothioneins. **Methods in Enzymology Metallochemistry B**, v. 205, p. 452-458, 1991.

VIARENGO, A.; NOTT, J. A. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. **Comp. Biochem. Physiol. C.**, v. 104, n. 3, p. 355-372, 1993.

WAELES, M.; RISO, R. D.; CABON, J.; MAGUER, J.; L'HELGUEN, S. Speciation of dissolved copper and cadmium in the Loire estuary and over the North Biscay continental shelf in spring. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 34, p. 139-146, 2009.

WAGENER, A. L. R.; MENICONI, M. F. G.; HAMACHER, C.; FARIAS, C. O.; SILVA, G. C.; GABARDO, I. T.; SCOFIELD, A. L. Hydrocarbons in sediments of a chronically contaminated bay: The challenge of source assignment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, p. 284-294, 2012.

WANICK, R. C. **Identificação de metalotioneínas em ostras *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) para aplicações ambientais.** Niterói, 2007. 92 f. Dissertação (Mestrado em Geociências – Geoquímica Ambiental) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2007.

WANICK, R. C.; BARBOSA, H. S.; FRAZÃO, L. R.; SANTELLI, R. E.; ARRUDA, M. A. Z.; COUTINHO, C. C. Evaluation of differential protein expression in *Haliclona aquarius* and sponge-associated microorganisms under cadmium stress. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 405, n. 24, p. 7661-7670, 2013.

WEBER, J. H. Review of possible paths for abiotic methylation of mercury (II) in the aquatic environment. **Chemosphere**, v. 26, p. 2063-2077, 1993.

WHO. **Cadmium-Environmental Aspects:** Environmental Health Criteria 135. Geneva, Switzerland: WHO, 1992. 156 p.

WHO. **Exposure to cadmium:** a major Public Health concern. Geneva, Switzerland: WHO, 2010. 4 p.

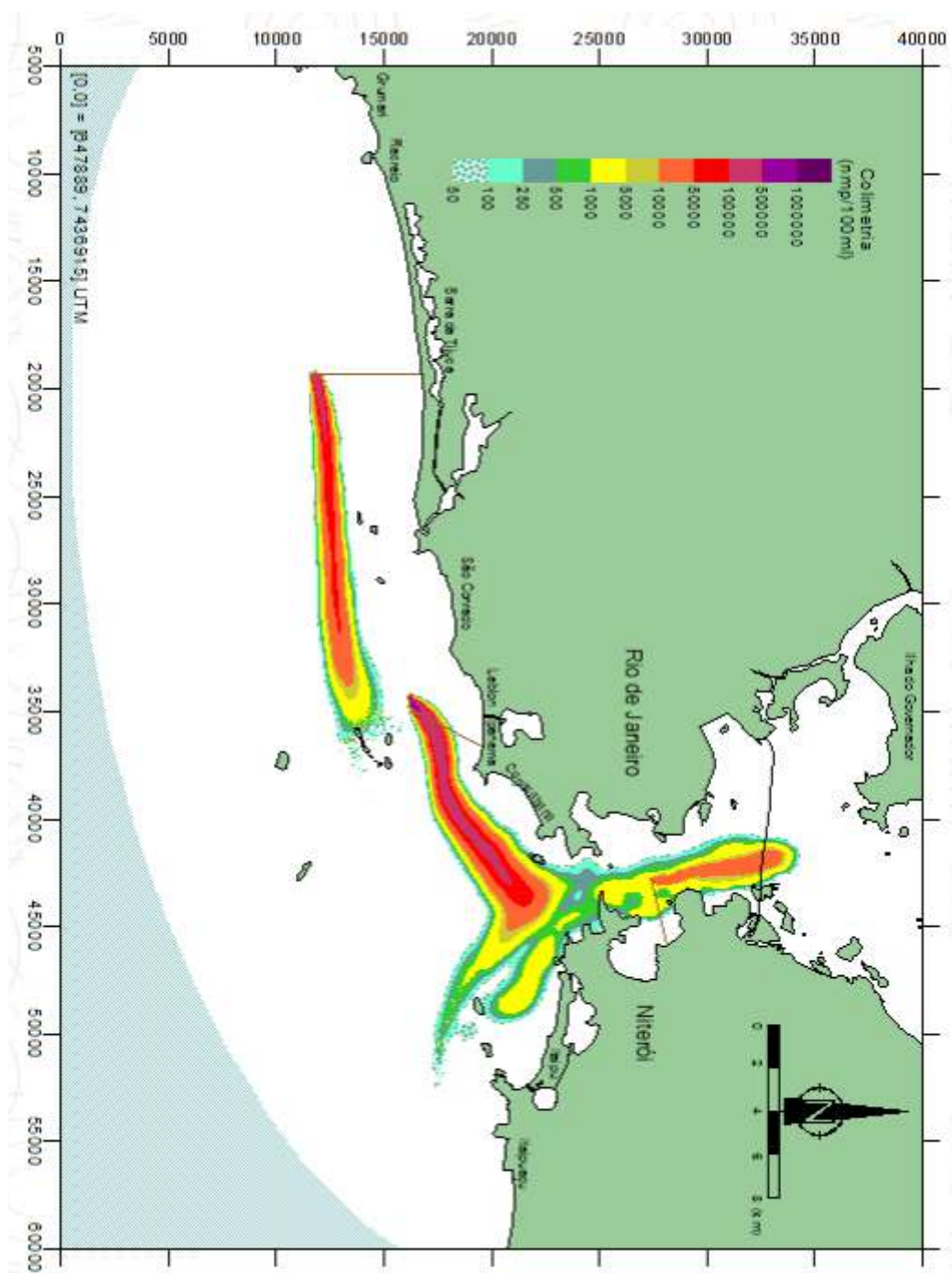
YANG, L.; MESTER, Z.; ABRANKO, L.; STURGEON, R. E. Determination of total chromium in seawater by isotope dilution sector field ICPMS using GC sample introduction. **Analytical Chemistry**, v. 76, p. 3510-3516, 2004.

YOSHIMINE, R. V.; CARREIRA, R. S.; SCOFIELD, A. L.; WAGENER, A. L. R. Regional assessment of PAHs contamination in SE Brazil using brown mussels (*Perna perna* Linnaeus 1758). **Mar. Pollut. Bull.**, v. 64, p. 2581-2587, 2012.

ŽAGAR, D.; PETKOVŠEK, G.; RAJAR, R.; SIRNIK, N.; HORVAT, M.; VOUDOURI, A.; KALLOS, G.; ČETINA, M. Modelling of mercury transport and transformations in the water compartment of the Mediterranean Sea. **Mar. Chem.**, v. 107, p. 64-88, 2007.

11 ANEXOS

11.1 ANEXO 1. SIMULAÇÃO DAS PLUMAS DOS EMISSÁRIOS SUBMARINOS



Fonte: FUNDAÇÃO COPPETEC – COPPE/UFRJ (SISBAHIA).

11.2 ANEXO 2. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E CARGA DE MPS NO MOMENTO DAS AMOSTRAGENS NOS ANOS DE 2009 E 2013

Estações de amostragem e suas respectivas variáveis físico-químicas (2009)

Estação	Temp. (°C)	Salin.	O.D. (% / mg/L)
Ilha Rasa	22,2	34,4	95,5 / 6,80
Ilha Redonda	22,7	34,7	96,5 / 6,79
Ilha Comprida	23,5	34,5	96,7 / 6,68
Cotunduba	22,2	34,3	99,2 / 7,05
Forte da Lage	24,2	33,2	149,9 / 11,27
Ponte Rio-Niterói	23,0	32,6	150 / 10,43
Ilha do Governador	26,3	26,2	N.D. / 2,9

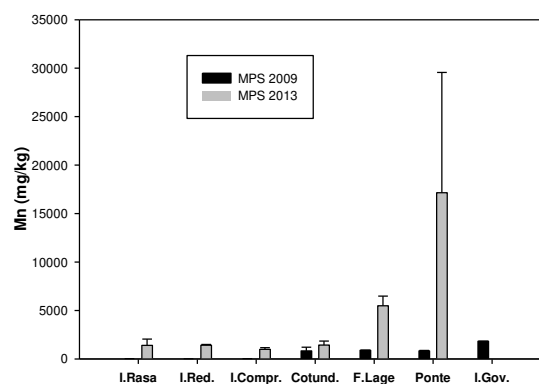
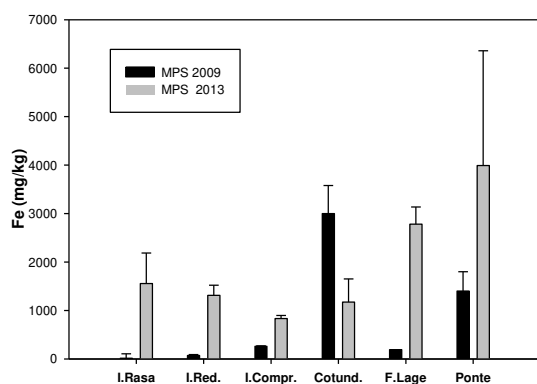
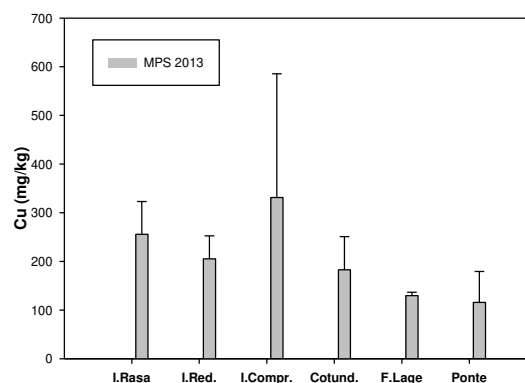
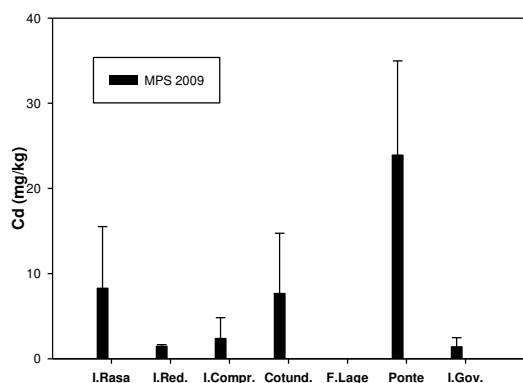
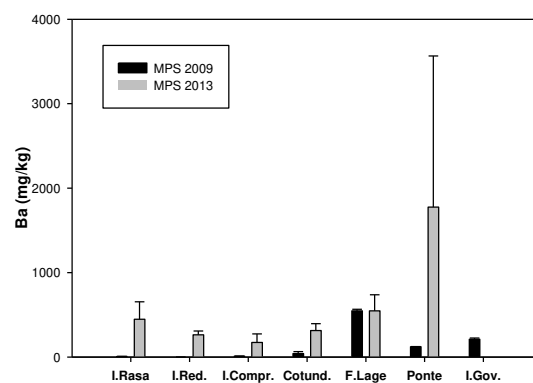
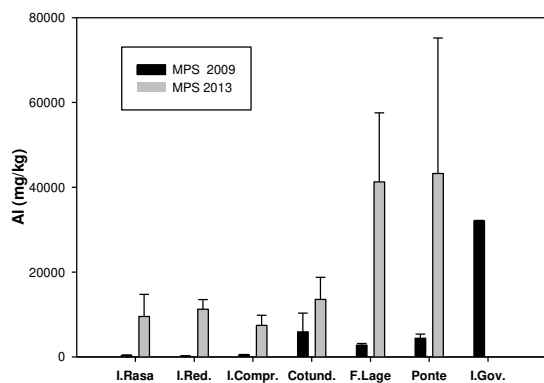
Estações de amostragem e suas respectivas variáveis físico-químicas (2013)

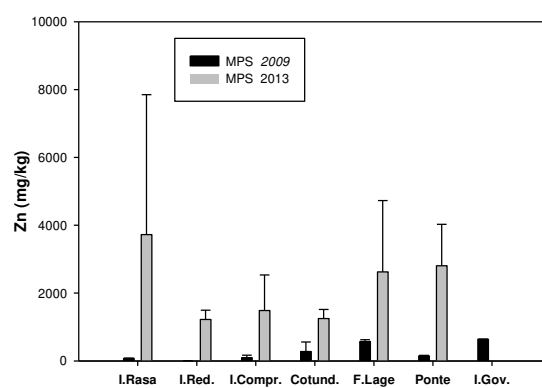
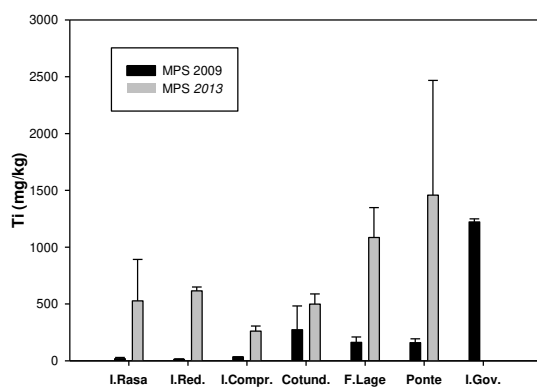
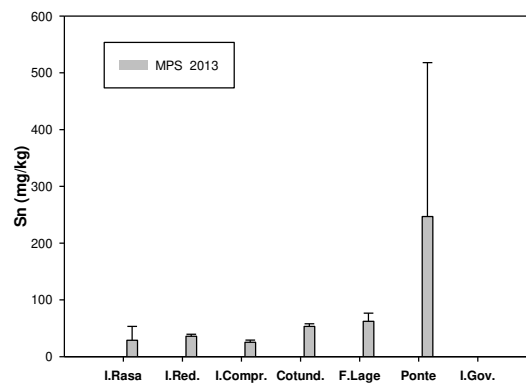
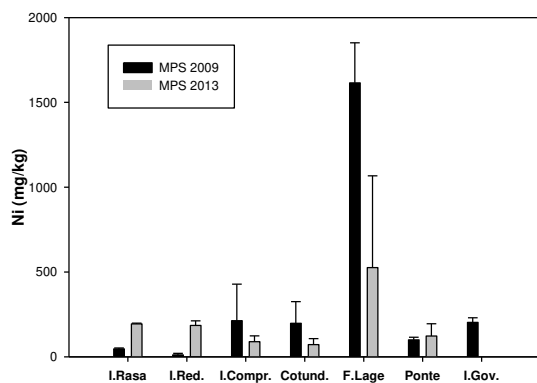
Estação	Temp. (°C)	Salin.	O.D. (% / mg/L)	Clorofila (g/L)	pH	COT (mg/L)
Ilha Rasa	24,3	34,4	119,7/8,18	4,0	8,04	1,89
Ilha Redonda	24,5	34,5	116,7/7,98	4,6	8,02	1,39
Ilha Comprida	24,4	34,6	116,5/8,00	3,5	7,86	1,63
Cotunduba	23,4	34,7	108,4/7,69	5,9	8,06	1,88
Forte da Lage	24,6	33,5	110,6/7,89	13,2	8,05	2,94
Ponte Rio-Niterói	25,2	30,1	167,2/11,20	61,5	8,55	6,04
Ilha do Governador	N.D.	N.D.	N.D./N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

Estações de amostragem (n = 7 estações (2009) e n = 6 (2013) e suas respectivas cargas de material particulado em suspensão (MPS) em duplicatas

Estação	MPS (mg/L) 2009	MPS (mg/L) 2013
Ilha Rasa	6,08 - 7,47	2,07 – 3,63
Ilha Redonda	10,2 – 13,6	1,80 – 1,95
Ilha Comprida	7,72 – 7,87	2,89 – 3,09
Cotunduba	3,68 – 11,8	2,96 – 4,64
Forte da Lage	84,4 - 111	3,65 – 4,55
Pte Rio-Niterói	27,3 – 30,6	1,64 – 7,08
Ilha do Governador	123 - 141	N.D.

11.3 ANEXO 3. MÉDIAS DAS CONCENTRAÇÕES DE METAIS NO MPS AO LONGO DAS ESTAÇÕES DE AMOSTRAGEM





11.4 ANEXO 4. TABELA DOS LIMITES PERMITIDOS PELA LEGISLAÇÃO PARA METAIS EM ALIMENTOS

	Elemento	Limite de tolerância (ppm)	Alimento	Referência
Legislação Nacional	Arsênio	1,0	Peixes e produtos da pesca	Ministério da Saúde (ANVISA), 1998
	Cádmio	1,0	Peixes e produtos da pesca	
	Chumbo	2,0	Peixes e produtos da pesca	
Legislação Nacional	Cromo	0,1	Alimentos	Ministério da Saúde (ANVISA), 1965
	Cobre	30	Alimentos	
	Zinco	50	Alimentos	
Legislação Internacional	Cromo	13	Moluscos	Food and Drug Administration, 1993
	Níquel	80	Moluscos	

11.5 ANEXO 5. MATRIZES DE CORRELAÇÃO PARA CONCENTRAÇÕES EM *B.CAISSARUM*

Matriz de correlação das concentrações de metais em *Bunodosoma caissarum* ($p < 0,05$, $n = 42$ amostras, duplicatas dos 21 espécimes amostrados em 7 estações).
Amostragem 2009

	Al	Ba	Cd	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Ti	V	Zn
Al	1,00											
Ba	-0,41	1,00										
Cd	-0,55	0,65	1,00									
Cr	0,29	0,10	-0,27	1,00								
Cu	0,53	-0,26	-0,40	0,32	1,00							
Fe	0,76	-0,34	-0,74	0,42	0,56	1,00						
Mn	0,83	-0,55	-0,72	0,34	0,48	0,74	1,00					
Ni	0,37	-0,23	-0,78	0,46	0,37	0,62	0,54	1,00				
Pb	-0,28	0,24	-0,26	0,08	-0,10	0,15	-0,11	0,29	1,00			
Ti	0,90	-0,33	-0,60	0,37	0,51	0,82	0,74	0,46	-0,10	1,00		
V	0,29	0,27	0,15	-0,17	0,17	-0,02	0,26	-0,09	-0,05	0,05	1,00	
Zn	0,79	-0,42	-0,75	0,29	0,35	0,70	0,77	0,53	0,15	0,73	0,24	1,00

Matriz de correlação das concentrações de metais em *Bunodosoma caissarum* ($p < 0,05$, $n = 60$ amostras, duplicatas dos 30 espécimes amostrados em 6 estações).
Amostragem 2013

	Al	As	Ba	Cd	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Sn	Ti	V	Zn
Al	1,00													
As	0,42	1,00												
Ba	0,63	0,45	1,00											
Cd	-0,47	-0,07	-0,27	1,00										
Cr	0,15	0,16	-0,12	0,01	1,00									
Cu	0,42	0,36	0,34	-0,47	0,13	1,00								
Fe	0,41	0,34	0,11	-0,26	0,29	0,74	1,00							
Mn	0,52	0,14	0,30	-0,54	0,03	0,52	0,60	1,00						
Ni	0,39	0,07	0,03	0,03	0,66	0,31	0,51	0,21	1,00					
Pb	0,34	0,39	0,46	-0,04	0,11	0,39	0,37	0,24	0,32	1,00				
Sn	0,32	0,08	0,28	-0,11	0,20	0,40	0,45	0,31	0,34	0,69	1,00			
Ti	0,84	0,57	0,59	-0,47	0,06	0,55	0,57	0,59	0,28	0,47	0,38	1,00		
V	0,50	0,03	0,26	-0,29	0,12	0,57	0,45	0,62	0,18	0,18	0,27	0,39	1,00	
Zn	0,38	0,30	0,08	-0,10	0,33	0,38	0,60	0,56	0,41	0,32	0,37	0,43	0,33	1,00

11.6 ANEXO 6. MATRIZES DE CORRELAÇÃO PARA CONCENTRAÇÕES EM *P. PERNA*

Matriz de correlação das concentrações de metais em *Perna* ($p < 0,05$, $n = 30$ amostras, duplicatas dos 15 espécimes amostrados em 5 estações). Amostragem 2009

	Al	Ba	Cd	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Ti	V	Zn
Al	1,00											
Ba	0,47	1,00										
Cd	-0,34	-0,53	1,00									
Cr	0,30	0,13	-0,08	1,00								
Cu	0,30	0,71	-0,73	0,10	1,00							
Fe	0,56	0,21	-0,28	0,77	0,29	1,00						
Mn	0,33	0,67	-0,79	0,24	0,81	0,40	1,00					
Ni	-0,25	-0,26	0,03	-0,10	0,20	0,00	0,21	1,00				
Pb	0,38	0,42	-0,66	0,05	0,58	0,40	0,62	-0,07	1,00			
Ti	0,93	0,49	-0,28	0,35	0,29	0,64	0,35	-0,28	0,34	1,00		
V	-0,31	-0,28	0,84	-0,11	-0,56	-0,43	-0,64	-0,12	-0,75	-0,21	1,00	
Zn	-0,19	0,03	-0,28	0,19	0,51	0,35	0,41	0,65	0,41	-0,19	-0,42	1,00

Matriz de correlação das concentrações de metais em *Perna perna* e dos parâmetros temperatura, salinidade e oxigênio dissolvido ($p < 0,05$, $n = 60$ amostras, duplicatas dos 30 espécimes amostrados em 6 estações). Amostragem 2013

	Al	As	Ba	Cd	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Sn	Ti	V	Zn
Al	1.00													
As	0.11	1.00												
Ba	0.36	0.28	1.00											
Cd	-0.32	0.56	0.09	1.00										
Cr	0.18	0.69	0.37	0.36	1.00									
Cu	0.22	-0.05	0.17	-0.61	0.05	1.00								
Fe	0.42	0.66	0.45	0.25	0.93	0.13	1.00							
Mn	0.20	-0.13	0.23	-0.65	-0.05	0.78	0.05	1.00						
Ni	0.30	0.66	0.30	0.33	0.86	0.17	0.82	0.06	1.00					
Pb	0.45	0.52	0.43	0.41	0.69	-0.10	0.75	-0.28	0.69	1.00				
Sn	0.26	0.55	0.12	0.21	0.75	0.18	0.71	-0.01	0.77	0.52	1.00			
Ti	0.93	0.15	0.35	-0.37	0.22	0.25	0.46	0.18	0.27	0.45	0.34	1.00		
V	0.03	0.63	0.15	0.82	0.61	-0.41	0.56	-0.56	0.62	0.67	0.40	-0.01	1.00	
Zn	0.23	0.38	0.00	0.11	0.33	0.24	0.38	0.33	0.53	0.14	0.42	0.22	0.28	1.00

12 APÊNDICE



Contents lists available at ScienceDirect

Marine Pollution Bulletin

journal homepage: www.elsevier.com/locate/marpolbul

Mercury distribution, methylation and volatilization in microcosms with and without the sea anemone *Bunodosoma caissarum*



Nafisa Rizzini Ansari^{a,*}, Raquel Rose Silva Correia^b, Marcos Antônio Fernandez^c, Renato Campello Cordeiro^a, Jean Remy Davée Guimarães^b

^a Departamento de Geoquímica, Universidade Federal Fluminense, Outeiro de São João Batista s/n, Instituto de Química, 5º andar, Centro, Niterói, RJ 24020-141, Brazil

^b Instituto de Biofísica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Bloco G/CCS/Ilha do Fundão, RJ 21941-902, Brazil

^c Faculdade de Oceanografia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, São Francisco Xavier St. 524, 4018E, Maracanã, RJ 20550-013, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 16 January 2015

Keywords:

Biomonitor
Cnidaria
Bioaccumulation
Methylmercury
Seawater

ABSTRACT

Mercury (Hg) has a complex biogeochemical cycle in aquatic environments. Its most toxic form, methylmercury (MeHg), is produced by microorganisms. This study investigated how the sea anemone *Bunodosoma caissarum* affects Hg distribution, methylation and volatilization in laboratory model systems. ²⁰³Hg was added to microcosms and its distribution in seawater, specimens and air was periodically measured by gamma spectrometry. MeHg was measured by liquid scintillation. After the uptake period, specimens had a bioconcentration factor of 70 and in microcosms with and without *B. caissarum*, respectively 0.05% and 0.32% of the initial spike was found as MeHg. After depuration, MeHg in specimens ranged from 0.2% to 2.4% of total Hg. Microcosms with *B. caissarum* had higher Hg volatilization (58%) than controls (17%), possibly due to Hg²⁺ reduction mediated by microorganisms associated with its tissues and mucus secretions. Marine organisms and their associated microbiota may play a role in Hg and MeHg cycling.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Mercury (Hg) is naturally present in low concentrations in aquatic environments. However, anthropogenic activities have increased Hg levels in the biosphere by a factor of at least three over the last century. This increase resulted in Hg enrichment in the oceans, especially in the surface waters, which directly exchange Hg with the atmosphere (Mason et al., 2012). Mercury can be a dangerous contaminant, although its ecological and toxicological effects are highly dependent on the chemical species present in the environment (Ullrich et al., 2001). The biogeochemical cycle of Hg in water is complex and is controlled by physical, chemical, and biological factors. The latter are especially governed by the activity of microorganisms (Correia et al., 2012b; Cossa et al., 2011; Heimbürger et al., 2010; Ullrich et al., 2001). Thus, it is difficult to predict the behavior of Hg species in natural waters. The main Hg forms in seawater are Hg⁰, complexes of Hg²⁺ with organic and inorganic ligands, and organic Hg forms, as

methylmercury (MeHg) and dimethylmercury (Horvat et al., 2003). Depending on the environmental conditions, inorganic Hg can be converted to more toxic methylated forms, such as MeHg (Correia et al., 2012b; Driscoll et al., 2012; Guimarães et al., 2000a; Ribeiro Guevara et al., 2008; Ullrich et al., 2001). In spite of the extensive literature concerning the behavior of Hg in aquatic environments, including the transformation and distribution mechanisms, there are still knowledge gaps in this area (Ribeiro Guevara et al., 2008, 2007; Tessier et al., 2007; Ullrich et al., 2001; Žagar et al., 2007).

Biomonitoring organisms can indicate the quality of the environment they inhabit. These organisms can be used to understand the temporal and geographical variations in the bioavailability of certain contaminants (Rainbow, 2002), such as Hg. Sea anemones are cnidarians. Despite their importance in the coastal environment worldwide, there are few studies related to metal accumulation in the tissues of cnidarians and even less in sea anemones (Mitchellmore et al., 2003; Main et al., 2010). The sea anemone *Bunodosoma caissarum* is a Brazilian endemic species and is widely distributed along the Brazilian coast (Russo et al., 1994; Amado et al., 2011). Organisms from this species can bioaccumulate Hg from the environment (Rizzini-Ansari, 2009). This species is also capable of incorporating in its tissues other metals such as

* Corresponding author.

E-mail addresses: nafisarizzini@yahoo.com (N. Rizzini Ansari), raquelrose10@gmail.com (R.R.S. Correia), hallfz@uerj.br (M.A. Fernandez), rcordeiro@geoq.uff.br (R.C. Cordeiro), jeanrd@biof.ufrj.br (J.R.D. Guimarães).

cadmium, copper and zinc (Rizzini-Ansari, 2011). In studies using α -emitters radioactive elements Gouvea et al. (1985, 1989) demonstrated that *B. caissarum* could be used as a bioindicator of contamination of chromium, cobalt and zinc. *B. caissarum* is sessile, usually inhabits intertidal rocky coasts and can be found exposed to the air during low tides or trapped inside upper littoral tidal pools (Amado et al., 2011; Russo et al., 1994). Its structure and the cellular mechanisms enables it to support extreme conditions, such as air exposure and fluctuations in salinity. This species has different mechanisms of adaptation for coping with stress situations, including mucus secretion, the presence of warts and the development of a protective dome shape (Amado et al., 2011).

Model ecosystems can be a useful tool for assessing the fate and the implications of mercury contamination in aquatic environments (Correia et al., 2012a; Tessier et al., 2007). Incubation experiments using isotope tracers allow modeling environments and processes that occur in nature. From these types of experiments, it is possible to investigate the distribution and the behavior of mercury in different environmental compartments by the construction of an indoor microcosm (Correia et al., 2012a; Ribeiro Guevara et al., 2008, 2007; Tessier et al., 2007). Microcosm experiments simulate natural environments and can be developed and later validated in real aquatic ecosystems (Mason et al., 1996; Tseng et al., 2001), supporting ecotoxicological risk assessments (Tessier et al., 2007). The use of radiochemical methods in model systems has the advantage of simplifying the experimental design. One of the reasons is that the determination of the initial total Hg and MeHg concentrations in all compartments is no longer required (Guimarães et al., 2000a). The ^{203}Hg is an artificially produced gamma emitter mercury isotope. This radiotracer is a good option for these types of study, since gamma spectrometry is non-destructive (Correia et al., 2012), allowing successive in vivo specimen measurements as well as ^{203}Hg measurement in materials such as tubing and stoppers, in which measuring Hg by conventional methods would be a challenge. Liquid samples such as MeHg extracts can be counted by liquid scintillation, with higher (80%) counting efficiencies. There have been previous microcosm experiments with soil, sediment, river water and macrophytes using ^{203}Hg (Correia et al., 2012a, 2012b; Gilmour and Riedel, 1995; Guimarães et al., 2000a, 2000b).

In the present study, ^{203}Hg was used to investigate the mechanisms of mercury distribution, methylation, volatilization, bioaccumulation and depuration in laboratory model systems with and without *B. caissarum*.

2. Material and methods

2.1. Sampling and acclimatization

A total of seven *B. caissarum* specimens were collected in Geribá beach (22°46'51.40"S and 41°54'15.38"W), located in Armação dos Búzios, in the state of Rio de Janeiro in the southeast of Brazil. This site is situated approximately 160 km from the urban area of the city of Rio de Janeiro. The *B. caissarum* specimens were carefully removed from the rocky substrate by snorkel divers and were transported to the laboratory in plastic boxes containing local seawater aerated by pumps. The organisms were then acclimatized to laboratory conditions for 30 days. Each specimen was settled in a 500 mL Pyrex beaker containing seawater under constant aeration, kept at approximately 22 °C, a pH of 7.84 and salinity of 33.7.

2.2. Incubation

The experimental design (Fig. 1) was adapted from Correia et al. (2012a). Different types of samples were incubated with ^{203}Hg in

500 mL beakers placed inside tightly sealed borosilicate desiccators. The desiccators had continuous air renovation by a negative pressure pump and trapping of Hg volatile forms into an acid KMnO_4 solution (0.125 mol/L in 0.5% sulfuric acid). This permitted the quantification of the volatile Hg species, mainly Hg^0 and dimethylmercury, in each system. Seven replicates of *B. caissarum* were placed in individual beakers containing ^{203}Hg -spiked unfiltered seawater and incubated for a 6 day long uptake experiment, followed by a depuration experiment of 48 days. Similar desiccators, with two 500 mL beakers containing only ^{203}Hg -spiked unfiltered seawater served as a control (Fig. 1).

A single initial spike of inorganic Hg, in the form of $^{203}\text{HgCl}_2$ (Eckert and Ziegler Isotope Products Laboratories, USA), was added to the water column of each microcosm. In systems containing unfiltered seawater the spike was of approximately 7.8×10^5 DPM/L – 0.351 uCi/L, while beakers containing seawater and *B. caissarum* were spiked with approximately 3.8×10^6 DPM/L – 1.712 uCi/L. Hg spikes were different for the two types of systems to ensure that Hg would be detectable in the filtered seawater until the end of the experiment. A higher amount of Hg was added to the microcosms containing *B. caissarum* to compensate for losses through uptake by the organisms. Immediately after the addition of ^{203}Hg , the desiccators were closed and sealed with high vacuum silicone grease. The seal was restored after each opening of the desiccators.

In the uptake experiment, ^{203}Hg activity was determined periodically in the seawater and in the specimens of all microcosms during 6 days. After that, the same seven specimens were submitted to a depuration process of 48 days. During depuration, the water was renewed with unspiked seawater at days 1, 6, 13, 21, 27, 35 and 48. ^{203}Hg activity in the seawater and in the organisms was determined just before each water renewal.

2.3. Analysis

Total ^{203}Hg ($T^{203}\text{Hg}$) activity in DPM (disintegrations per minute) was determined in each sample by gamma spectrometry. Most samples were analyzed on a Perkin Elmer Wizard 2480 automatic gamma counter. *B. caissarum* specimens were rinsed with unspiked seawater and radioassayed in vivo in beakers. The beakers containing *B. caissarum* were counted in manual mode on a Perkin Elmer Wizard 1470 automatic gamma counter, placing the specimens on the top of the well-type NaI(Tl) detector and aligning the geometric centers of both specimens and detector. With this 2π geometry counting efficiency was 10%. Water samples of 2 mL were counted in capped test tubes in the detector well and with this 4π geometry counting efficiency was 93.6%. Counting efficiency was determined by counting geometry, and was previously measured using standard ^{203}Hg solutions, reproducing the real counting conditions of the different samples (water and KMnO_4 solutions in test tubes in well geometry, sea anemones in 50 mL beakers in planar geometry, etc.). Efficiency for each geometry was used to convert relative activity (CPM, counts per minute) into absolute activity (DPM), making all counting data directly comparable. The lower counting efficiency was obtained when counting sea anemones samples in planar geometry, but because of their mass and Hg accumulation capacity, ^{203}Hg was comfortably detectable in anemones at all sampling times. All results obtained in CPM by gamma spectrometry were corrected to DPM taking into account the counting efficiency at each counting geometry, the equipment background and ^{203}Hg decay.

Me^{203}Hg was extracted and measured using a method adapted from Guimarães et al. (2000b, 1995). MeHg extraction proceeds by adding 4 mL of 3 M NaBr in 11% H_2SO_4 and 1 mL of 0.5 M CuSO_4 . Samples are then shaken, centrifuged and the Me^{203}Hg present in the supernatant is extracted with a scintillation cocktail containing

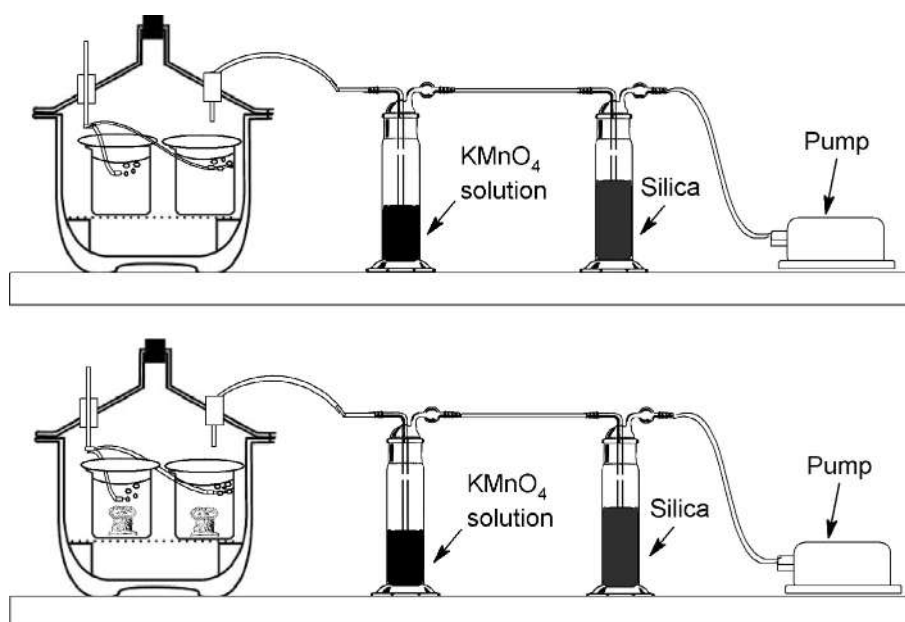


Fig. 1. Incubations containing only seawater (upper desiccator) and seawater and *B. caissarum* (lower desiccators).

toluene and the scintillation salts POP (2,5-diphenyloxazole) and POPOP [1,4-bis-2-(5-phenyloxazolyl)-benzene]. After this procedure, the organic extracts are transferred to scintillation vials and kept in the dark for 24 h to eliminate chemiluminescence before measurement on a Perkin Elmer Tri-Carb 2800TR liquid scintillation analyzer. MeHg was expressed in DPM after the correction for ^{203}Hg decay, quenching, background and extraction efficiency. Results are expressed as the percentage of total added ^{203}Hg that was converted into Me^{203}Hg . This methodology cannot separate methylation and demethylation rates, thus yielding only an estimate of potential net methylation rates.

To evaluate total Hg (THg) distribution in microcosms ^{203}Hg was analyzed in all compartments. The seawater, the organism's tissues, the mucus secretion, the settled particles, the volatilized fraction, the silicone aeration tubes and swabs of the microcosms' glass walls were gamma-analyzed for the determination of T^{203}Hg activity. Me^{203}Hg content in the seawater and in the organisms' tissues was measured as well. Details of the analysis are described in the following sections.

2.3.1. *B. caissarum*

The seven specimens of *B. caissarum* had their T^{203}Hg content (in DPM) measured at days 1, 2, 4 and 6 in the uptake experiment. During the depuration process, THg was determined in the specimens just before each water renewal, which occurred at days 1, 6, 13, 21, 27, 35 and 48.

After the 48 days of depuration, the seven specimens of *B. caissarum* were rinsed with Milli-Q water and frozen. Subsequently, the samples were freeze-dried and then ground. After this treatment, T^{203}Hg and Me^{203}Hg were measured in the tissues of each specimen.

2.3.2. Seawater

The seawater of each microcosm was analyzed for T^{203}Hg after the initial spike and also at days 1, 2, 4 and 6. In the last day of the uptake experiment, T^{203}Hg and Me^{203}Hg were also measured in both the particulate and dissolved fractions of the seawater in each microcosm. Two seawater samples of 200 mL were taken from each system and filtered through 0.22 μm Millipore cellulose ester membranes.

In each beaker, duplicates of the filters and of the filtrate were gamma-analyzed for determination of T^{203}Hg and then extracted for Me^{203}Hg quantification. During the depuration experiment, T^{203}Hg in seawater was determined just before each water renewal.

2.3.3. Volatilization

^{203}Hg activity was measured in the KMnO_4 solution of each desiccator to evaluate Hg volatilization in each of them. A 12% hydroxylamine chloride solution was used to dissolve the KMnO_4 precipitates formed on the gas bubbler walls. The KMnO_4 and hydroxylamine chloride solutions were measured in days 2 and 6 of the uptake experiment and in the last day of depuration. Thereby, the total volatilized Hg was calculated as the sum of the decay-corrected activities of the KMnO_4 solutions and the hydroxylamine chloride wash solutions.

2.3.4. Settled particles, mucus secretion, adsorption on microcosm walls, silicone seals and silicone aeration tubes

The mucus secretion of the *B. caissarum* specimens, the settled particles, the silicone aeration tubes, the microcosms' glass walls (beakers, watch glasses and desiccators) and the desiccators' silicone seals from each treatment were gamma-analyzed on the last day of incubation. Cotton swabs soaked in KMnO_4 acid solution were used to remove ^{203}Hg adsorbed to the glass surfaces of desiccators, beakers and watch glasses. The silicone grease used to seal the desiccators was removed with a spatula and gamma-analyzed.

3. Results and discussions

^{203}Hg was detected in all the microcosm compartments. Data on T^{203}Hg and Me^{203}Hg activities in the seawater and in *B. caissarum* and on the distribution of T^{203}Hg in each of the compartments of the microcosms are shown below.

3.1. T^{203}Hg activity in *B. caissarum* and in seawater

All *B. caissarum* specimens were able to bioaccumulate Hg from the initial ^{203}Hg spike. At the end of the uptake experiment, ^{203}Hg in seawater decreased to 0.5–1.3% of its initial activity in the microcosms with *B. caissarum* and to 1.6–2.1% in the microcosms

without *B. caissarum*. The specimens reached an average bioconcentration factor (BCF) of 70; this factor was calculated as $[\text{THg}] B. caissarum (\text{dpm g}^{-1} \text{ wet weight}) / [\text{THg}] 0.22 \mu\text{m filtered seawater} (\text{dpm mL}^{-1})$. In a 6 day incubation experiment with *Perna viridis* mussels in seawater spiked with HgCl_2 bioconcentration factors ranged from 126 to 404, depending on added Hg concentrations (Lakshmanan and Nambisan, 1989).

After the depuration period of 48 days, *B. caissarum* specimens still retained 35–70% of the THg bioaccumulated during the uptake experiment (Fig. 2). At the above cited 6 day incubation experiment with *P. viridis* those mussels were exposed to a medium with no added Hg for 20 days and maintained 76.7% of the accumulated Hg (Lakshmanan and Nambisan, 1989). *B. caissarum* and *Perna perna* presented different depuration patterns. While *B. caissarum* depurated at a relatively constant rate (Fig. 2) *P. perna* had a rapid depuration in the first days and retained only 15% of the accumulated Hg (Anandraj et al., 2002). The authors concluded that this rapid loss from tissues might limit the use of *P. perna* for biomonitoring in, for example, situations of variable pollution outfalls. In these circumstances of variable Hg concentrations *B. caissarum* could be a more effective biomonitor.

3.2. THg distribution

The distribution of T^{203}Hg among the different compartments of the microcosms is shown in Fig. 3. The total ^{203}Hg spike added at the beginning of the experiment was not totally recovered. In the treatments with *B. caissarum*, 88% of the initial ^{203}Hg spike was recovered. Meanwhile in the treatments without *B. caissarum*, the recovery was 80%. This might have occurred due to an incomplete extraction of Hg adsorbed to the glass surfaces and/or by the loss of particulate material attached to the specimens when those were rinsed with unspiked seawater before measurements.

In both types of microcosms Hg was present in all the compartments tested. In the treatments containing *B. caissarum*, the higher Hg amount corresponded to the volatilized fraction. In the incubation without *B. caissarum* the tubes, beaker walls and the volatilized fraction were the compartments with higher Hg percentages (Fig. 3).

Total Hg volatilization in the treatment containing only seawater was approximately 17% of the total ^{203}Hg initial spike. However, THg volatilization in the systems containing seawater and *B. caissarum* was 58%, more than three times higher (Fig. 3). The opposite would be expected, as Hg uptake by *B. caissarum* and complexation with the by-products of its metabolism would reduce the availability of Hg for reduction and volatilization. However, the presence of labile organic matter such as mucus secretions in *B. caissarum* microcosms may increase bacterial activity, contributing to a higher volatilization. Microorganisms do play an important role in the cycling of Hg in aquatic ecosystems (Driscoll et al., 2012; Ullrich et al., 2001). They can catalyze many inter-conversions between different Hg forms, as reduction and methylation (Correia et al., 2012b; Mason et al., 2012; Ullrich et al., 2001). Reduction of Hg^{2+} is also caused by photo-chemical reactions involving humic substances (Allard and Arsenie, 1991; Lanzillotta et al., 2002). This experiment does not permit distinguishing between inorganic Hg (Hg^0) and dimethylmercury in the volatile fraction. However, Hg^0 is the prevailing form of dissolved gaseous Hg in marine ecosystems, and its transfer to the atmosphere happens due to Hg^0 low water solubility and high volatility (Mason et al., 1995; Soerensen et al., 2010). Correia et al. (2012a) performed a similar ^{203}Hg incubation experiment with freshwater macrophytes. The authors observed a lower ^{203}Hg volatilization than in the present study, and in an opposite pattern as the microcosms with and without macrophytes lost respectively 0.48% and 5.26% of their total ^{203}Hg spike. Although the volatiliza-

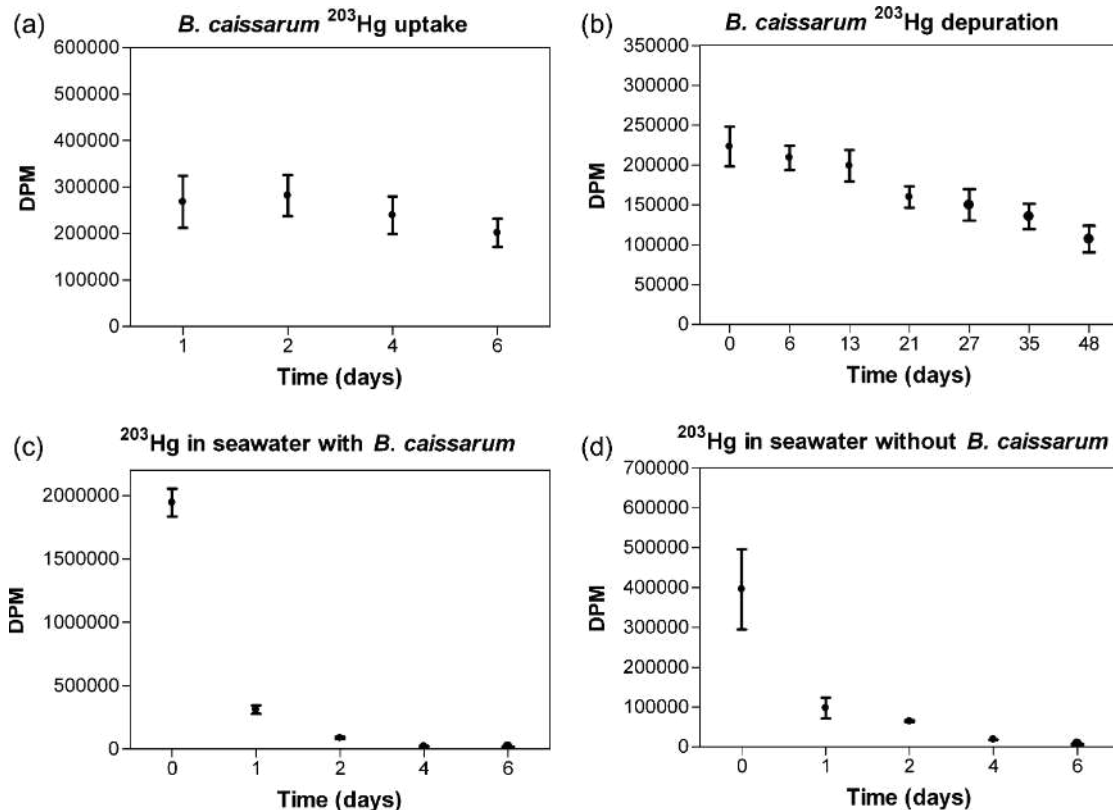


Fig. 2. ^{203}Hg activity in *B. caissarum* during uptake (a) and depuration (b) periods and in the seawater from the microcosms with (c) and without (d) *B. caissarum*.

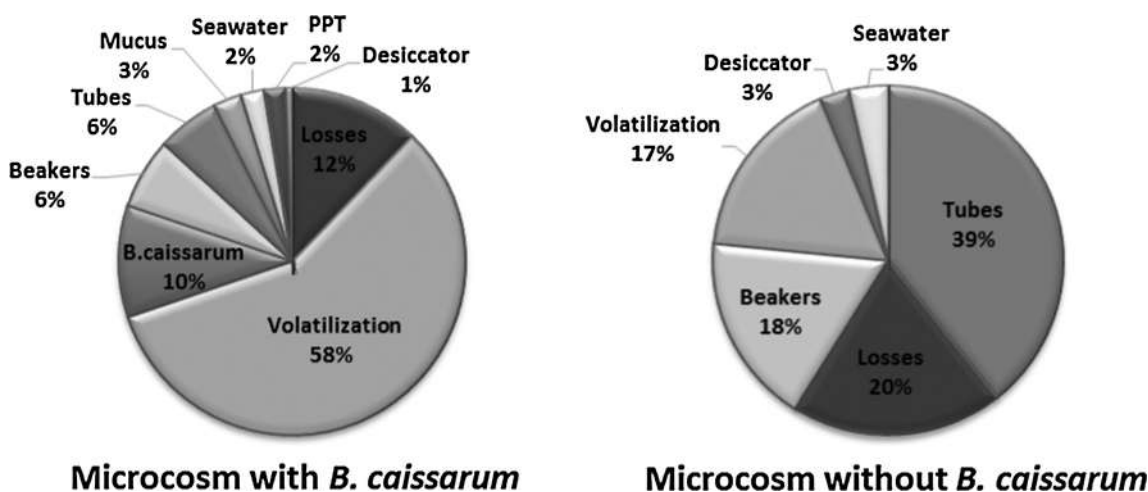


Fig. 3. THg distribution (%) in different compartments of the microcosms with and without *B. caissarum*.

tion was not high in systems with macrophytes, results suggested that Hg^{2+} reduction was mainly mediated by root-associated microorganisms. On the other hand, Battke et al. (2008) detected the phyto-reduction of Hg^{2+} to volatile Hg^0 by endogenous ascorbic acid in different species of trees and plants in levels many times higher than the controls. These species were transplanted to hydroponic systems and cultivated on a $HgCl_2$ medium. Bacterial reduction was discarded. It was concluded that the reduction of Hg occurs along the lines of these species' antioxidative defense and is an important mechanism of detoxification. In the present study, it is also possible that an unknown detoxification mechanism of *B. caissarum* caused the high Hg volatilization. Since in this current study in the microcosms with *B. caissarum* volatilization was threefold higher than in the controls, with similar photochemical conditions, additional Hg^{2+} reduction was probably mediated by microorganisms.

3.3. MeHg in seawater and *B. caissarum*

In both treatments, $Me^{203}Hg$ formation was observed (Fig. 4). After the uptake experiment, MeHg was quantified in the seawater of all microcosms. In the seawater from microcosms containing *B. caissarum* 4.4–8.4% of the total Hg in the dissolved fraction was in the form of MeHg. In those microcosms, MeHg in the particulate

fraction ranged from 0.1% to 2.7% of the total particulate Hg. In the seawater from the microcosms without *B. caissarum*, MeHg in the dissolved fraction corresponded to 31.3–39.4% of the total Hg in this fraction. From 8.3% to 9.5% of the total Hg in the particulate fraction corresponded to MeHg. Combining the MeHg in the seawater (after the uptake experiment) and in the tissues of the specimens (measured after depuration), the total MeHg in the microcosms with *B. caissarum* corresponded to 0.05% of the initial ^{203}Hg spike. In the microcosms without *B. caissarum* 0.32% of the initial ^{203}Hg spike in the seawater was converted to MeHg. So there were higher levels of total $Me^{203}Hg$ in the microcosms without *B. caissarum*. In an incubation experiment, with sediment, freshwater, waterweeds and snails, Tessier et al. (2007) also recorded higher MeHg concentrations in the water column of the control microcosms. The same authors observed a higher content of inorganic Hg in water available for methylation in the control systems when compared to the treatments, suggesting this as a possible reason for the increased MeHg concentration in the controls. According to the authors, under the experimental conditions in those systems, microorganisms were allowed to develop and to contribute to MeHg production and accumulation in the water column without a competitive bioaccumulation by the macroorganisms. This is a possible explanation for the lower MeHg levels measured in the microcosms containing *B. caissarum* in the present

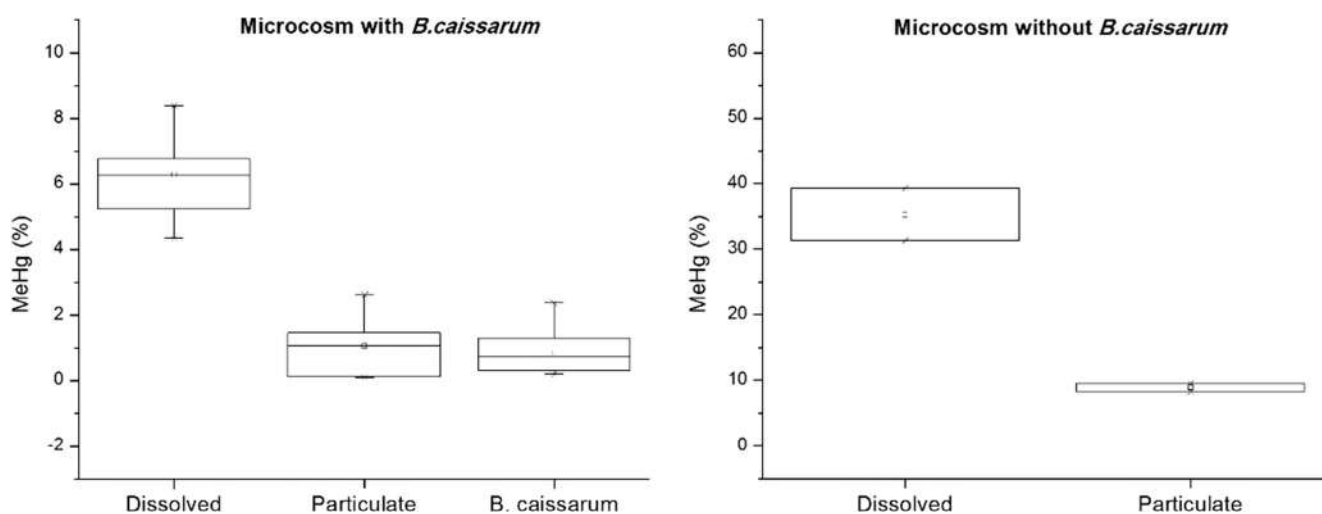


Fig. 4. Average MeHg as % of THg found in seawater (dissolved and particulate fractions) and *B. caissarum* in both types of microcosms.

work, as the THg available for methylation was lower than in the control microcosm. The THg percentages of the initial spike in the seawater of microcosms with *B. caissarum* in days 1, 2, 4 and 6 were respectively 16.1%, 4.6%, 1.2% and 0.9% and in the controls levels were respectively 24.7%, 16.4%, 4.7% and 1.8% (Fig. 2). Moreover, at the end of the uptake experiment there were higher amounts of suspended particulate matter (SPM) in microcosms with *B. caissarum* (103 mg L^{-1}) than in controls (9.4 mg L^{-1}). For this reason, it should be easier for Hg ions to form complexes with SPM in microcosms with *B. caissarum* and so Hg would be less available for methylation than in controls.

A drawback of the set-up used in the present study is that, due to the destructive nature of MeHg extraction and the higher volumes required quantifying it in water, it can only be measured in seawater or specimens at the end of incubation. This does not allow an estimate of how much MeHg was demethylated during incubations or to follow the time-course of net MeHg formation.

After the depuration process, MeHg was determined in the tissues of the specimens of *B. caissarum*. From 0.2% to 2.4% of the total ^{203}Hg content in its tissues were in the form of Me^{203}Hg (Fig. 4). MeHg in the tissues of the specimens was not measured after the uptake experiment in order to preserve them for subsequent depuration experiments and this may have allowed some unmeasured Me^{203}Hg demethylation in the tissues. On the other hand, Me^{203}Hg was not measured in mucus secretions of the specimens. For these reasons, the total MeHg formation in microcosms containing *B. caissarum* was probably underestimated. Given this experimental design, it is not possible to establish how much of the Me^{203}Hg in *B. caissarum* was formed in the specimens themselves and how much was formed in seawater or mucus secretions and then accumulated by *B. caissarum*.

This experiment demonstrated the formation of Me^{203}Hg in the seawater in the microcosms without *B. caissarum*. Several authors have observed the production of MeHg in the water column of freshwater systems (Ribeiro Guevara et al., 2008, 2007; Tessier et al., 2007), although Hg methylation is considered to occur predominantly in sediment (Tessier et al., 2007), periphyton (Correia et al., 2012b; Mauro et al., 2002) and epilithon (Desrosiers et al., 2006). Koron et al. (2012) detected Me^{197}Hg production in seawater of incubation experiments with the radiotracer ^{197}Hg in different incubation periods. However, it is generally recognized that in the marine environment MeHg production occurs mainly in the sediments (Merritt and Amirbahman, 2009). Substances present in the water, such as humic matter, algal and microorganism secretions and chloride ions may have a great influence in Hg methylation in the water column (Siciliano et al., 2005; Weber, 1993). The presence of dissolved organic carbon (DOC) in the water, especially the quality rather than the quantity, may increase mercury methylation (Babiarz et al., 2003; Ribeiro Guevara et al., 2008). DOC bacterial degradation may enhance the availability of methyl groups, which can promote the methylation activity (Ribeiro Guevara et al., 2008). Marine studies suggest that there is a linear relationship between Hg methylation and organic matter decomposition rates in the water column (Cossa et al., 2011; Heimbürger et al., 2010). Several microorganisms can influence the methylation of inorganic Hg, such as sulfate-reducing bacteria and methanogenic bacteria (Correia et al., 2012b; Hamelin et al., 2011; Ribeiro Guevara et al., 2008; Ullrich et al., 2001). Methylation mediated by microorganisms tends to be more efficient depending on the activity and the structure of the bacterial community, the availability of Hg and nutrients and the abundance of electron acceptors such as sulfate (Choi and Bartha, 1994; Macalady et al., 2000; Tessier et al., 2007). On the other hand, Heimbürger et al. (2010), Malcolm et al. (2010) and Mason et al. (2012) reported that the main methylating organisms in coastal and freshwater environments are anaerobic bacteria. However, it appears that these

bacteria play a less important role in the marine water column, where methylation seems to be most closely linked to organic carbon decomposition that occurs throughout the upper ocean waters. Hg methylation does not occur only in oxygen deficient environments, such as in marine sediments (Duran et al., 2008; Hollweg et al., 2009) or in estuarine biofilm communities (Huguet et al., 2010). There is evidence that Hg methylation occurs in oxic seawater where bacteria decompose (remineralization) the sinking flux of particulate organic matter in the water column (Conaway et al., 2009; Cossa et al., 2009, 2011; Hammerschmidt and Bowman, 2012; Lehnher et al., 2011; Monperrus et al., 2007; Sunderland et al., 2009). MeHg production in oxic seawater is not totally elucidated. It might be due to abiotic methylation (Celo et al., 2006) or could be produced *in situ* by aerobic microbial activity (Monperrus et al., 2007) or mediated by anaerobic microorganisms associated with anoxic microenvironments, as decomposing remains of plankton (Heimbürger et al., 2010). The role of microorganisms in Hg methylation in seawater is still a knowledge gap. But our results suggest that even in low DOC conditions this process may be important.

4. Conclusions

B. caissarum is a relatively efficient Hg bioaccumulator. It reached an average bioconcentration factor of 70 and retained from 35% to 70% of the previously bioaccumulated Hg after a depuration of 48 days. Since *B. caissarum* maintained a large percentage of the bioaccumulated Hg after a long depuration period, this species would be indicated for biomonitoring sites with variable Hg concentrations.

The presence of *B. caissarum* resulted in a higher volatilization of Hg. This increased volatilization is possibly a result of reactions mediated by the microorganisms associated with its tissues and mucus secretions.

In both microcosms, MeHg formation was observed. A higher level of MeHg was detected in the seawater from the microcosm without *B. caissarum*. The reason for this might be that under these conditions the microorganisms were allowed to grow and to contribute to MeHg production without the Hg bioaccumulation interference of *B. caissarum*. Another possibility is that *B. caissarum* readily incorporated part of the MeHg produced. Hg was probably less available for methylation in microcosms with *B. caissarum* because of bioaccumulation and due to the higher concentrations of suspended particulate matter that could form complexes with Hg. This experiment demonstrated the formation of MeHg in the seawater of microcosms without *B. caissarum*. However, we should note that in the microcosms containing *B. caissarum* this experiment does not permit a conclusion as to whether MeHg was formed in the specimens themselves, in the seawater, or in the mucus secretions and then accumulated by *B. caissarum*.

More than an illustration of an experimental design or a study on the role of a specific marine species on Hg methylation and volatilization, our aim here was to draw attention to a gap in studies on these processes in marine systems. Many studies have shown significant MeHg production in freshwater sites with intense bacterial activity – such as sediment surfaces, macrophyte periphyton and epilithon – and also in marine sediments. However, there is still much to be elucidated about MeHg production in oxic marine environments. The same can be said about the role of microorganisms associated with marine fauna in Hg cycling and speciation.

Acknowledgments

We thank the Brazilian research foundations FAPERJ (Proc. 111.459/2012), CNPq (Proc. 484073/2011-7) and CAPES (PhD

fellowship) for the research grants that made this study possible. A special thanks to Malcolm Bush for the help with the English version.

References

- Allard, B., Arsenie, I., 1991. Abiotic reduction of mercury by humic substances in aquatic system – an important process for the mercury cycle. *Water Air Soil Pollut.* 56, 457–464.
- Amado, E.M., Vidolin, D., Freire, C.A., Souza, M.M., 2011. Distinct patterns of water and osmolyte control between intertidal (*Bunodosoma caissarum*) and subtidal (*Anemonia sargassensis*) sea anemones. *Comp. Biochem. Phys. A* 158, 542–551.
- Anandraj, A., Marshall, D.J., Gregory, M.A., McClurg, T.P., 2002. Metal accumulation, filtration and O₂ uptake rates in the mussel *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia) exposed to Hg²⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺. *Comp. Biochem. Phys. C* 132, 355–363.
- Babiarz, C.L., Hurley, J.P., Krabbenhoft, D.P., Gilmour, C., Branfireun, B.A., 2003. Application of ultrafiltration and stable isotopic amendments to field studies of mercury partitioning to filterable carbon in lake water and overland runoff. *Sci. Total Environ.* 304, 295–303.
- Battke, F., Ernst, D., Fleischmann, F., Halbach, S., 2008. Phytoreduction and volatilization of mercury by ascorbate in *Arabidopsis thaliana*, European beech and Norway spruce. *Appl. Geochem.* 23, 494–502.
- Celo, V., Lean, D.R.S., Scott, S.L., 2006. Abiotic methylation of mercury in the aquatic environment. *Sci. Total Environ.* 368, 126–137.
- Choi, S.C., Bartha, R., 1994. Environmental factors affecting mercury methylation in estuarine sediments. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 53 (6), 805–812.
- Conaway, C.H., Black, F.J., Gault-Ringold, M., Pennington, J.T., Chavez, F.P., Flegal, A.R., 2009. Dimethylmercury in coastal upwelling waters, Monterey Bay, California. *Environ. Sci. Technol.* 43, 1305–1309.
- Correia, R.R.S., Oliveira, D.C.M., Guimarães, J.R.D., 2012a. Total mercury distribution and volatilization in microcosms with and without the aquatic macrophyte *Eichhornia Crassipes*. *Aquat. Geochem.* 18, 421–432.
- Correia, R.R.S., Miranda, M.R., Guimarães, J.R.D., 2012b. Mercury methylation and the microbial consortium in periphyton of tropical macrophytes: effect of different inhibitors. *Environ. Res.* 112, 86–91.
- Cossa, D., Averty, B., Pirrone, N., 2009. The origin of methylmercury in open mediterranean waters. *Limnol. Oceanogr.* 54, 837–844.
- Cossa, D., Heimbürger, L.-E., Lannuzel, D., Rintoul, S.R., Butler, E.C.V., Bowie, A.R., Averty, B., Watson, R.J., Remenyi, T., 2011. Mercury in the southern ocean. *Geochim. Cosmochim. Acta* 75, 4037–4052.
- Desrosiers, M., Planas, D., Mucci, A., 2006. Mercury methylation in the epilithon of boreal shield aquatic ecosystems. *Environ. Sci. Technol.* 40, 1540–1546.
- Driscoll, C.T., Chen, C.Y., Hammerschmidt, C.R., Mason, R.P., Gilmour, C.C., Sunderland, E.M., Greenfield, B.K., Buckman, K.L., Lamborg, C.H., 2012. Nutrient supply and mercury dynamics in marine ecosystems: a conceptual model. *Environ. Res.* 119, 118–131.
- Duran, R., Ranchou-Peyruse, M., Menuet, V., Monperrus, M., Bareille, G., Goñi, M.S., Salvado, J.C., Amouroux, D., Guyoneaud, R., Donard, O.F.X., Caumette, P., 2008. Mercury methylation by a microbial community from sediments of the Adour Estuary (Bay of Biscay, France). *Environ. Pollut.* 156, 951–958.
- Gilmour, C.C., Riedel, G.S., 1995. Measurement of Hg methylation in sediments using high specific-activity ²⁰³Hg and ambient incubation. *Water Air Soil Pollut.* 80, 747–756.
- Gouvea, R.C.S., Santos, P.L., Gouvea, V.A., 1985. Contaminação radioativa de *Bunodosoma caissarum* Corrêa, 1964 (Cnidaria, actinidae) sob condições controladas. *Rev. Bras. Biol.* 45 (1/2), 101–104.
- Gouvea, R.C., Santos, P.L., Dutra, I.R., 1989. Uptake of ²¹⁰Pb and ²¹⁰Po by Brazilian *Bunodosoma caissarum* Corrêa, 1964 (Cnidaria, Actinidae). *Sci. Total Environ.* 83, 181–183.
- Guimarães, J.R.D., Malm, O., Pfeiffer, W.C., 1995. A simplified radiochemical technique for measurement of net mercury methylation rates in aquatic systems near goldmining areas, Amazon, Brazil. *Sci. Total Environ.* 172 (2), 151–162.
- Guimarães, J.R.D., Ikingura, J., Akaji, H., 2000a. Methyl mercury production and distribution in river water-sediment systems investigated through radiochemical techniques. *Water Air Soil Pollut.* 124, 113–124.
- Guimarães, J.R.D., Roulet, M., Lucotte, M., Mergler, D., 2000b. Mercury methylation along a lake-forest transect in the Tapajós river floodplain, Brazilian Amazon: seasonal and vertical variations. *Sci. Total Environ.* 261, 91–98.
- Hamelin, S., Amyot, M., Barkay, T., Wang, Y., Planas, D., 2011. Methanogens: principal methylators of mercury in lake periphyton. *Environ. Sci. Technol.* 45, 7693–7700.
- Hammerschmidt, C.R., Bowman, K.L., 2012. Vertical methylmercury distribution in the subtropical North Pacific Ocean. *Mar. Chem.* 132–133, 77–82.
- Heimbürger, L.E., Cossa, D., Marty, J.C., Migon, C., Averty, B., Dufour, A., Ras, J., 2010. Methyl mercury distributions in relation to the presence of nan- and picoplankton in an oceanic water column (Ligurian Sea, North-western Mediterranean). *Geochim. Cosmochim. Acta* 74, 5549–5559.
- Hollweg, T.A., Gilmour, C.C., Mason, R.P., 2009. Methylmercury production in sediments of Chesapeake Bay and the mid-Atlantic continental margin. *Mar. Chem.* 114, 86–101.
- Horvat, M., Kotnik, J., Fajon, V., Logar, M., Zvonarik, T., Pirrone, N., 2003. Speciation of mercury in surface and deep-sea waters in the Mediterranean Sea. *Atmos. Environ.* 37 (S1), 93–108.
- Huguet, L., Castelle, S., Schäfer, J., Blanc, G., Maury-Brachet, R., Reynouard, C., Jorand, F., 2010. Mercury methylation rates of biofilm and plankton microorganisms from a hydroelectric reservoir in French Guiana. *Sci. Total Environ.* 408, 1338–1348.
- Koron, N., Bratkic, A., Guevara, S.R., Vahcic, M., Horvat, M., 2012. Mercury methylation and reduction potentials in marine water: an improved methodology using ¹⁹⁷Hg radiotracer. *Appl. Radiat. Isotopes* 70, 46–50.
- Lakshmanan, P.T., Nambisan, P.N.K., 1989. Bioaccumulation and depuration of some trace metals in the mussel, *Perna viridis* (Linnaeus). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 43, 131–138.
- Lanzillotta, E., Ceccarini, C., Ferrara, R., 2002. Photo-induced formation of dissolved gaseous mercury in coastal and offshore seawater of the Mediterranean basin. *Sci. Total Environ.* 300, 179–187.
- Lehnherr, I., St. Louis, V.L., Hintelmann, H., Kirk, J.L., 2011. Methylation of inorganic mercury in polar marine waters. *Nat. Geosci.* 3, 298–302.
- Macalady, J.L., Mack, E.E., Nelson, D.C., Scow, K.M., 2000. Sediment microbial community structure and mercury methylation in mercury-polluted clear lake, California. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (4), 1479–1488.
- Main, W.P.L., Ross, C., Bielmyer, G.K., 2010. Copper accumulation and oxidative stress in the sea anemone, *Aiptasia pallida*, after waterborne copper exposure. *Comp. Biochem. Phys. C* 151, 216–221.
- Malcolm, E.G., Schaefer, J.K., Ekstrom, E.B., Tuit, C.B., Jayakumar, A., Park, H., Ward, B.B., Morel, F.M.M., 2010. Mercury methylation in oxygen deficient zones of the oceans: no evidence of predominance of anaerobes. *Mar. Chem.* 122, 11–19.
- Mason, R.P., Rolffhus, K.R., Fitzgerald, W.F., 1995. Methylated and elemental mercury cycling in surface and deep ocean waters of the North Atlantic. *Water Air Soil Pollut.* 80, 665–677.
- Mason, R.P., Reinfelder, J.R., Morel, F.M.M., 1996. Uptake, toxicity, and trophic transfer of mercury in a coastal diatom. *Environ. Sci. Technol.* 30, 1835–1845.
- Mason, R.P., Choi, A.L., Fitzgerald, W.F., Hammerschmidt, C.R., Lamborg, C.H., Soerensen, A.L., Sunderland, E.M., 2012. Mercury biogeochemical cycling in the ocean and policy implications. *Environ. Res.* 119, 101–117.
- Mauro, J.B.N., Guimarães, J.R.D., Hintelmann, H., Watras, C.J., Haack, E.A., Coelho-Souza, S.A., 2002. Mercury methylation in macrophytes, periphyton, and water – comparative studies with stable and radio-mercury additions. *Anal. Bioanal. Chem.* 374, 983–989 (Special issue).
- Merritt, K.A., Amirbahman, A., 2009. Mercury methylation dynamics in estuarine and coastal marine environments – a critical review. *Earth-Sci. Rev.* 96, 54–66.
- Mitchellmore, C.L., Verde, E.A., Ringwood, A.H., Weis, V.M., 2003. Differential accumulation of heavy metals in the sea anemone *Anthopleura elegantissima* as a function of symbiotic state. *Aquat. Toxicol.* 64, 317–329.
- Monperrus, M., Tessier, E., Amouroux, D., Leynaert, A., Huonnic, P., Donard, O.F.X., 2007. Mercury methylation, demethylation, and reduction rates in coastal and marine surface waters of the Mediterranean Sea. *Mar. Chem.* 107, 49–63.
- Rainbow, P.S., 2002. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environ. Pollut.* 120, 497–507.
- Ribeiro Guevara, S., Žižek, S., Repinc, U., Pérez Catán, S., Jaćimović, R., Horvat, M., 2007. Novel methodology for the study of mercury methylation and reduction in sediments and water using ¹⁹⁷Hg radiotracer. *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 2185–2197.
- Ribeiro Guevara, S., Queimaliños, C.P., Diéguez, M.C., Arribère, M., 2008. Methylmercury production in the water column of an ultratropical lake of Northern Patagonia, Argentina. *Chemosphere* 72 (4), 578–585.
- Rizzini-Ansari, N., 2009. Evaluation of the sea anemone *Bunodosoma caissarum* as a bioindicator species of THg contamination in Guanabara Bay: a comparison with the mussel *Perna perna*. Senior Thesis, Faculdade de Oceanografia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 46p (In portuguese).
- Rizzini-Ansari, N., 2011. Comparison of the metal contamination in the internal and the external sectors of Guanabara Bay using *Bunodosoma caissarum* and *Perna perna* as bioindicator species. M.A. Thesis in Geociências – Environmental Geochemistry, Universidade Federal Fluminense, 139p (In portuguese).
- Russo, C.A.M., Solé-Cava, A.M., Thorpe, J.P., 1994. Population structure and genetic variation in two tropical sea anemones (Cnidaria, Actinidae) with different reproductive strategies. *Mar. Biol.* 119, 267–276.
- Siciliano, S.D., O'Driscoll, N.J., Tordon, R., Hill, J., Beauchamp, S., Lea, D.R., 2005. Abiotic production of methylmercury by solar radiation. *Environ. Sci. Technol.* 39, 1071–1077.
- Soerensen, A.L., Sunderland, E.M., Holmes, C.D., Jacob, D.L., Yantosca, R.M., Skov, H., Christensen, J.H., Strode, S.A., Mason, R.P., 2010. An improved global model for air-sea exchange of mercury: high concentrations over the North Atlantic. *Environ. Sci. Technol.* 44, 8574–8580.
- Sunderland, E.M., Krabbenhoft, D.P., Moreau, J.W., Strode, S.A., Landing, W.M., 2009. Mercury sources, distribution, and bioavailability in the North Pacific Ocean: insights from data and models. *Global Biogeochem. Cycles* 23. <http://dx.doi.org/10.1029/2008GB003425>.
- Tessier, E., Martin-Doimeadios, R.C.R., Amouroux, D., Morin, A., Lehnhoff, C., Thybaud, E., Vindimian, E., Donard, O.F.X., 2007. Time course transformations and fate of mercury in aquatic model ecosystems. *Water Air Soil Pollut.* 183, 265–281.

- Tseng, C.M., Amouroux, D., Abril, G., Tessier, E., Etcheber, H., Donard, O.F.X., 2001. Speciation of mercury in a fluid mud profile of a highly turbid macrotidal estuary (Gironde, France). *Environ. Sci. Technol.* 35, 2627–2633.
- Ullrich, S.M., Tanton, T.W., Abdrashitova, S.A., 2001. Mercury in the aquatic environment: a review of factors affecting methylation. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 31, 241–293.
- Weber, J.H., 1993. Review of possible paths for abiotic methylation of mercury (II) in the aquatic environment. *Chemosphere* 26, 2063–2077.
- Žagar, D., Petkovšek, G., Rajar, R., Sirmik, N., Horvat, M., Voudouri, A., Kallos, G., Četina, M., 2007. Modelling of mercury transport and transformations in the water compartment of the Mediterranean Sea. *Mar. Chem.* 107, 64–88.